

# **Über den Einfluß von körperlichem Training und Altern auf morphometrische Parameter und spezifische Zellmarker bei Wistar-Kyoto und Spontan Hypertensiven Ratten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von	Peter Hofmann
aus	Arborn

Aus dem Max-Planck-Institut  
für Physiologische und Klinische Forschung  
Kerkhoff-Institut  
Abteilung Experimentelle Kardiologie  
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper  
In Bad Nauheim

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Schaper  
Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation: 18.Juni 2002

*für Elfi*

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>5</b>
2.1. Gewebe und Vorbehandlung	5
2.1.1. Gewebematerial	5
2.1.2. Tiermodell	5
2.1.3. Aufzucht	6
2.1.4. Lauftraining	6
2.1.5. Konservierung der Herzen	6
2.1.6. Kryotomie	6
2.1.8. Geräte	7
2.2. Übersicht der histochemischen und Immunfluoreszenz- Markierungsmethoden	7
2.2.1. Histochemische Färbemethoden	8
Hämatoxilin - Eosin	8
Sirius Rot F3 BA-Kollagenfärbung	8
2.3. Immunfluoreszenz - Markierungsmethoden	9
2.4. Fluorescein Apoptose Protokoll für Myozyten	11
2.5. Quantitative Morphometrische Verfahren	12
2.5.1. Morphologische Beurteilung	13
2.5.2. Bestimmung der Volumendichte von Kollagen / Siriusrotfärbung	13
2.5.3. Bestimmung der Myozytenbreite / Vinculin	13
2.5.4. Bestimmung der Kapillar- und Myozytendichte / EC-NOS	14
2.5.5. Bestimmung von CD 45 positiven Zellen	14
2.5.6. Bestimmung apoptotischer Zellen	15
2.5.7. Bestimmung aFGF positiver Zellen	15
Bestimmung TGF- $\beta$ positiver Zellen	15
2.6. Statistische Methoden	15

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>16</b>
3.1.	Statistische Ergebnisse	16
3.2.	Qualitative Beurteilung	16
3.3.	Histo- und Immunhistochemie	17
3.3.1.	Bestimmung der Volumendichte an Kollagen	17
3.3.2.	Bestimmung der Myozytenbreite	20
3.3.3.	Bestimmung der Kapillardichte	22
3.3.4.	Bestimmung der Myozytendichte	24
3.3.5.	Verhältnis Kapillardichte/Myozytendichte	25
3.3.6.	Bestimmung von CD 45 positiven Zellen	26
3.3.7.	Bestimmung apoptotischer Zellen	28
3.3.8.	Bestimmung von ACE positiven Arealen	29
3.3.9.	Bestimmung aFGF positiver Zellen	31
3.3.10.	Bestimmung von TGF- $\beta$ positiven Zellen	32
3.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	33
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>35- 69</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung (Summary)</b>	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	
<b>7.</b>	<b>Lebenslauf</b>	
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	

# 1. Einleitung

In den Industrieländern gehört die Arterielle Hypertonie mit der hierdurch induzierten Herzhypertrophie und koronaren Herzkrankheit zu den häufigsten Ursachen der kardiovaskulären Mortalität <sup>1</sup>. In der Altersgruppe der 60 bis 69-jährigen beträgt die Prävalenz der Hypertonie mehr als 60%. Daher ist eine Klärung der pathophysiologischen Mechanismen, die zur Entwicklung der hypertensiven Herzkrankheit und einer Herzhypertrophie führen, von besonderem Interesse.

Pathophysiologisch existieren verschiedene Hypothesen zur Entstehung der Hypertonie. Hier seien nur einige zitiert, wie die Annahme, daß eine verstärkte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systemes, erhöhte Spiegel von Aldosteron, oder verminderte Freisetzung von ANP (Atrialer natriuretischer Faktor) eine Rolle spielen können <sup>2-4</sup>. Präventive therapeutische Empfehlungen und Maßnahmen könnten sich aus Erkenntnissen ergeben, die im Tiermodell gewonnen wurden und zu einer Reduktion der kardiovaskulären Mortalität führen.

Wir beschäftigten uns daher hier mit einem Tiermodell, der Spontan Hypertensiven Ratte (SHR), das bereits breite Anwendung zur Erforschung der essentiellen Hypertonie des Menschen gefunden hat und ebenso eine genetisch bedingte Prädisposition zur arteriellen Hypertonie, Linksherzhypertrophie (Druckhypertrophie) und Herzinsuffizienz besitzt. Die Kontrollgruppe zu den Spontan Hypertensiven Ratten waren gleich alte Wistar Kyoto Ratten (WKY), ein Rattenstamm der als normotensive Vergleichsgruppe dient. Hierbei handelt es sich um Tiere, die zwar gemeinsame Vorfahren mit dem Stamm der SHR haben. Der SHR Stamm wurde jedoch gezielt auf das Merkmal arterielle Hypertonie rückgekreuzt.

Bei dem Tiermodell der Spontan Hypertensiven Ratte besteht etwa ab der 9. Lebenswoche eine genetisch bedingte Druckhypertrophie <sup>5</sup>. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit bei einigen Altersgruppen mit dem Versuch gekoppelt durch Lauftraining von kurzer Dauer (max. 4 Wochen) eine zusätzliche Volumenhypertrophie zu induzieren.

Andere setzten dazu einen chronischen AV-Block <sup>6</sup>, maximale körperliche Aktivität wie Laufen oder Schwimmen <sup>7</sup> oder die Anlage arteriovenöser Fisteln ein. Bei körperlichem Training bewirkt die Skelettmuskulatur einen stärkeren Rückstrom venösen Blutes durch die Muskelpumpe. Das Herz reagiert auf die Belastung durch Ausdauertraining mit einer Linksherzhypertrophie.

Zur Erzeugung von Druckhypertrophie existieren noch etliche andere Modelle, wie zum Beispiel die Induktion eines renalen Hypertonus durch Abklemmen von Nierenarterien (Goldblatt Modell) oder die Einführung einer Stenose der Aorta, hohe Salzbelastung oder die medikamentöse Beeinflussung des Blutdrucks durch Gabe von Katecholaminen oder Schilddrüsenhormonen wie Thyroxin.

Neben der hierdurch induzierten Hypertrophie des einzelnen Kardiomyozyten besteht der Anpassungsvorgang der Herzhypertrophie in einer Veränderung der kraftübertragenden Strukturen des Interstitiums (Kollagen). Bei SHR ist ein vermehrtes Auftreten von Fibrosearealen vor allem perivaskulär bekannt. Dies wird gemeinsam mit der interstitiell auftretenden Fibrose auch als reaktive Fibrose bezeichnet, während eine Fibrose, wie sie sich nach dem Untergang von einzelnen Myozyten im Zuge der Narbenbildung entwickelt, als reparative Fibrose bezeichnet wird. Bei langdauernder arterieller Hypertonie finden sich beide Formen der Fibrose im linken Ventrikel<sup>8</sup>. Die Fragestellung war hier nun, ob neben dem Auftreten von lokalisierten Fibrosearealen eine generalisiert gesteigerte Synthese von interstitieller Substanz (hier Kollagen) in Abhängigkeit vom Alter und der dynamischen Herzbelastung zu verzeichnen war, ob sich quantitativ inadäquate Anpassungsvorgänge ergeben würden im Sinne einer pathologischen Hypertrophie und ob sich dies mit morphometrischen Methoden nachweisen ließe.

Zusätzlich wurde in die morphometrische Betrachtung miteinbezogen, wie sich im Verhältnis zur Interzellulärsubstanz Myozyten- und Kapillardichte jeweils in Abhängigkeit zum Alter verhielten. Außerdem wurde die Frage untersucht, ob bei diesem Hypertrophie-Modell und seinen Anpassungsvorgängen durch Methoden der Immunfluoreszenz spezifische Zellmarker und Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta_1$ , acidic FGF neben einem Marker für T-Leukozyten (CD 45) und das Angiotensin-Converting Enzym vermehrt oder in anderer Lokalisation nachweisbar sind.

Darüberhinaus wurde der Frage nachgegangen, ob sich hinsichtlich der Apoptose, des programmierten Zelltodes, deutliche Differenzen zwischen sehr jungen und sehr alten Rattenherzen finden lassen.

Die Fragestellung lautete also:

1. Ist bereits bei jungen Ratten (unter 1 Jahr) eine deutliche Differenz in den morphologischen und stereologischen Parametern zwischen beiden Stämmen für Fibrose, Myozytendurchmesser, numerische Kapillardichte gegeben?
2. Wie wirkt sich eine zusätzliche Belastung durch Lauftraining auf die obengenannten Parameter aus?

3. Gibt es ein hierzu unterschiedliches histologisch/morphometrisch nachweisbares Reaktionsmuster auf Laufbelastung bei adulten Tieren (über 1 Jahr) abhängig von den Tierstämmen?
4. Sind Unterschiede bei seneszenten Tieren der SHR und Kontrollgruppe von WKY zu erkennen, die morphometrisch die Gegenüberstellung einer normalen Herzmorphologie gegenüber einer pathologischen erlauben?
5. Eine Pilotuntersuchung mit Bestimmung der apoptotischen Zellen sollte klären, ob es hinsichtlich der Mechanismen, die schließlich zu einem Herzversagen führen, eine deutliche Tendenz zum programmierten Zelltod der Kardiomyozyten bei seneszenten SHR gibt, die die Hypothese einer Altersatrophie des Herzens stützen könnte.

Daneben sollte diese Untersuchung zur Frage Aufschluß geben, ob eine reparative Fibrose bei seneszenten Tieren überwiegt, da sich bei verstärktem Myozytenuntergang neben nekrotischen in dieser Gruppe eine erhöhte Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten finden lassen müßte.

6. Eine weitere Hypothese, die von einer Beteiligung inflammatorischer Zellen im Zusammenhang mit vermehrter Fibrose des hypertrophen Herzens ausgeht, sollte anhand der Bestimmung von CD 45-positiven Zellen in verschiedenen Altersgruppen überprüft werden.
7. Gibt es eine positive Beziehung der „normalen Altersvorgänge“ zu den Veränderungen, die bei Hypertonie gesehen werden?





## 2. Material und Methoden

### 2.1. Gewebe und Vorbehandlung

#### 2.1.1. Gewebematerial

Es wurden Rattenherzen von männlichen SHR und Wistar-Kyoto Ratten altersgleicher Gruppen für die histologische Untersuchung benutzt, die uns freundlicherweise die Firmen Bayer® und Aventis® zur Verfügung stellten. Pro Versuchsgruppe standen die Herzen von drei bis vier Tieren einer Altersgruppe zur Verfügung. Die einzelnen Gruppen teilten sich wie folgt auf:

Tab.1

<b>WKY und WKY-Kontrolle</b>	<b>n</b>	<b>SHR</b>	<b>n</b>
4 Wochen*	3	4 Wochen	3
9 Wochen*	3	9 Wochen	3
12 Wochen*	3	12 Wochen	3
14 Wochen*	3	14 Wochen	3
20 Wochen 1 Wo. Lauftraining.	3		
20 Wochen 2 Wo. Lauftraining	3	20 Wochen 4 Wo. Lauftraining	3
14 Monate*	3	14 Monate	3
14 Monate 2 Wo. Lauftraining.	3	14 Monate 2 Wo. Lauftraining.	3
15 Monate*	4	15 Monate	4
22 Monate*	4	22 Monate	4
<b>Σ</b>	<b>29</b>		<b>29</b>

#### 2.1.2. Tiermodell

Das Tiermodell der Spontan Hypertensiven Ratte zur Erforschung der Essentiellen Arteriellen Hypertonie leitet sich von einem erstmals von Okamoto und Aoki beschriebenen Ratteninzuchtstamm ab, der aus Wistar Ratten der Universität Kyoto stammt. Diese Tiere entwickeln durch eine polygene Vererbung zu hundert Prozent eine arterielle Hypertonie.

### **2.1.3. Aufzucht**

Die verwendeten Tiere wurden unter Standardbedingungen (12 Stunden Hell-Dunkelzyklus, 50% Luftfeuchtigkeit, 21°C Raumtemperatur) mit freiem Zugang zu Wasser und kommerziell erhältlichem Futter aufgezogen.

### **2.1.4. Lauftraining**

Zur Erzeugung einer Volumenhypertrophie des linken Ventrikels wurde als Modell die Laufbelastung gewählt. Das Lauftraining bestand aus einer definierten Laufbelastung auf dem Laufband für die Zeitdauer von einer Stunde pro Tag. Die Belastung wurde bezüglich der Geschwindigkeit langsam gesteigert. Die Laufgeschwindigkeit betrug am Ende der ein-, zwei- bzw. vierwöchigen Laufphase 1,6 km/h.

### **2.1.5. Konservierung der Herzen:**

Die Versuchstiere wurden durch kraniale Dislokation getötet. Nach Entnahme des Herzens wurde dieses zunächst in kardioplegischer Lösung entblutet, dann sofort im Ganzen in einen Behälter mit Methylbutan gegeben, der wiederum in flüssigem Stickstoff schwamm und anschließend in flüssigem Stickstoff nachgefroren. Dieses Vorgehen verhindert, daß durch zu großen Temperaturunterschied die Herzen während des Gefriervorganges platzen und zerreißen.

Die Lagerung der tiefgefrorenen Präparate erfolgte dann bei Minus 80°C.

### **2.1.6. Kryotomie**

Zur Einbettung benutzten wir tissue tec<sup>®</sup>, das den Halt des Herzens auf einem Korkstück herstellte. Das Korkstück wiederum konnte in einem zweiten Arbeitsgang mit tissue tec<sup>®</sup> auf einem Gewebehalter für das Kryotom fixiert werden.

Von den tiefgefrorenen Herzen wurden Gefrierschnitte als Transversalschnitte in der Mitte der Herzlängsachse hergestellt. Für die Aufnahme der Gefrierschnitte benutzten wir Objektträger, die zuvor mit Silikon beschichtet wurden. Die weitere Verarbeitung ist bei den histochemischen und immunhistochemischen Methoden beschrieben.

### 2.1.8. Geräte

Zur Herstellung von 4  $\mu\text{m}$  dicken Gefrierschnitten diente ein Kryostat der Firma Leitz (Kryostat 1720). Zum Durchmustern der Präparate und für die morphometrischen Untersuchungen benutzten wir das Mikroskop (Fa. Leitz Variophot Aristoplan bzw. Leitz DM RB), das sowohl die Möglichkeit der Lichtmikroskopie, wie auch der Fluoreszenzmikroskopie bietet.

Einige Abbildungen wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop erstellt. Hiermit lassen sich optisch dünnere Schichten als 1  $\mu\text{m}$  „schneiden“. Basis war ein Leitz DM RBE. Der luftgekühlte Argonlaser stammt von der Fa. Omnichrome, Chino, California, USA.

Objektträger (Fa. Menzel Super Frost ISO-Norm 8037)

Deckgläser (Fa. Marienfeld)

Pipetten (Fa. Eppendorf)

2 verchromte Inkubationskammern mit Plastiksteg

## 2.2. Übersicht der histochemischen und Immunfluoreszenz - Markierungsmethoden

Zuordnung der einzelnen Färbe- und Markierungsmethoden zu den jeweiligen Untersuchungen.

Tab. 2

Färbe- bzw. Markierungsmethode	Untersuchungsgang
HE	Morphol. Beurteilung
Sirius Red	Volumendichte Kollagen → Fibrose
Vimentin	Fluoreszenzmikroskop. Beurteilung
TGF- $\beta$ / Acidic FGF	Fluoreszenzmikroskop. Beurteilung
ACE	Fluoreszenzmikroskop. Beurteilung
Vinculin	Bestimmung Myozytenbreite
EC-NOS	Bestimmung Kapillardichte/Myozytendichte
CD 45	Bestimmung pos. Zellen/Gesichtsfeld
TUNEL	Bestimmung pos. Zellen/ $10^5$ Kerne

Im Folgenden werden die einzelnen histochemischen und Immunfluoreszenz - Methoden detaillierter beschrieben, um sie bei der morphometrischen Methodenbeschreibung nur noch kurz zu nennen.

### **2.2.1. Histochemische Färbemethoden**

#### **Hämatoxilin – Eosin**

- Fixierung in Xylol für ca. 20 Min.
- absteigende Alkoholreihe
- Aqua dest.
- Hämalalaun ca. 10 Min.
- Spülen in lauwarmem Wasser
- Aqua dest.
- Eosin ca. 5 Min.
- aufsteigende Alkoholreihe
- Xylol
- Eindecken mit Entellan

#### **Sirius Rot F3 BA für Kollagenfärbung (Sweat et al.1964)**

- 4  $\mu$ m Schnitte
- Fixierung in Bouinlösung ohne Essigsäure
- kurz in 70% Alkohol
- Sirius Rot-Färbung für 1 Stunde
- Waschen in 0.01N HCL für 2 Minuten um Überfärben zu vermeiden
- kurz in Aqua dest.
- Hämalalaunfärbung zum Darstellen der Kerne für 5 - 10 Min (bei Bedarf)
- lauwarmes Leitungswasser
- Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (95%, 100%)
- Xylol
- Eindecken mit Entellan

Die Lösung wird als 0,1% Lösung in gesättigter wässriger Pikrinsäure angerührt. Hersteller des Farbstoffs Sirius Rot F3BA ist die Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH + Co.,Köngen. Der Farbstoff färbt Kollagen I und III.

### 2.3. Immunfluoreszenz - Markierungsmethoden

Allgemein lassen sich die Schritte einer Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern basierend auf den Arbeiten von Coons et al. wie folgt beschreiben:

- Kryostatschnitt herstellen
- Schnitte auf vorbereitete silikonbeschichtete Objektträger aufbringen
- Fixierung in frischem Paraformaldehyd 2% oder kaltem Aceton für 10 Minuten
- Waschen in PBS - Puffer
- Aufbringen des I. Antikörpers (in der Regel monoklonale Antikörper von Hybridomzellen der Maus)
- Inkubation in feuchter Inkubationskammer für 1 Stunde
- 3 maliges Waschen der Schnitte in PBS für je 2 Minuten
- Aufbringen des II. biotinkoppelten Antikörpers (hier in der Regel: Anti-Maus biotinkonjugiert (Antikörper von der Ziege, Fa. Sigma, Verdünnung 1:100) oder Anti-Maus IgG Antikörper vom Esel biotinkonjugiert (Fa. Jackson Immuno Research Labor. Inc.
- Inkubation in feuchter Inkubationskammer für 1 Stunde
- 3 maliges Waschen der Schnitte in PBS für je 2 Minuten

Aufbringen von Streptavidin gekoppelt mit einem Fluoreszenzfarbstoff (hier: Fluoresceinisothiocyanat oder Cy 2 als Fluorochrom).

Die für die einzelnen Antikörper benutzten Verdünnungstufen beruhen auf Erfahrungswerten und variieren je nach Anzahl der Kopplungsschritte (Ein-, Zwei-, Dreischrittmethode; auch als Direkte Immunfluoreszenztechnik und Indirekte Immunfluoreszenz bezeichnet). Hier wurde bis auf die Vimentinmarkierung, die als Zweischrittmethode mit direkt gekoppeltem Fluorochrom am zweiten Antikörper, erfolgte, ausschließlich die oben beschriebene Dreischrittmethode benutzt.

#### Negativkontrolle

Als Negativkontrolle benutzten wir pro Inkubationsdurchgang einen Schnitt, bei dem der erste Antikörper weggelassen wurde, während alle anderen Schritte wie oben beschrieben durchgeführt wurden, um eine unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers auszuschließen. Wenn dieser Schnitt kein oder kaum ein Fluoreszenzsignal ergab, akzeptierten wir die Markierung als spezifische Antigen-Antikörper-Bindung, vorausgesetzt, daß sich das Zielantigen auch im entsprechenden Kompartiment des Gewebes befand (Bsp.: Vimentin an Bindegewebszellen)

Unspezifische Kreuzreaktionen vor allem von polyklonalen Antikörpern können vorkommen und bewirken z.B. eine Fluoreszenzmarkierung an den Glanzstreifen des Myokards, ohne daß diese als Lokalisation des Zielantigenes bekannt wären.

Zusammensetzung der PBS-Lösung:

158,8g NaCl

4,0g KCl

4,0g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

28,4g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

in 2 l destilliertem Wasser gelöst, eingestellt auf pH 7,4

### Antikörper-Markierungen

Sämtliche folgenden genannten I. Antikörper wurden als monoklonale Antikörper benutzt, die alle von Maushybridomzellen produziert wurden.

Tab. 3:

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Vin 11-5	1:40	Sigma, St. Louis MO
ACE	1:100	Chemicon Int. Inc. , Temecula, CA
TGF- $\beta$ 1	1:100	R u D Systems, Wiesbaden
$\alpha$ -FGF	1:50	Upstate Biotechnol. Inc. Lake Plac, NY
Vimentin	1:3	dianova immunotech, Hamburg
CD 45	1:50	OX-1, Oncogene Science, Uniondale ,NY
EC-NOS	1:50	Transduction Lab. KY

## 2.4. Fluorescein Apoptose Protokoll für Myozyten

(In situ-nick-end labeling Markierung fragmentierter DNA = TUNEL- Methode)

Kryostat-Gewebeschnitte der Herzen von einer Gruppe sehr junger 4 Wochen alter SHR (n = 3), die noch keine Hypertonie entwickelt haben und der Gruppe seneszenten SHR (22 Monate alt, n = 4) wurden zur Beurteilung der Rate an apoptotischen Zellen dem folgenden Protokoll unterzogen. Das Testkit (S7110) ApopTag<sup>®</sup> stammte von der Fa Intergen Company, Oxford und enthielt wichtige Reagenzien, wie DNase, TdT und Äquilibrierungs- und Stoppuffer. Mit der Methode werden enzymatisch die freien 3'OH-Enden von DNA mit veränderten Nucleotiden markiert. Fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen diese Nukleotide ergeben das Fluoreszenzsignal innerhalb von Kernen oder apoptotischen Körperchen. Sowohl Einzelstrang- wie auch Doppelstrangbrüche der DNA werden erkannt.

Als positive Kontrollen benutzten wir hier Myokard von Ratten nach Vorbehandlung mit DNase und Ileum vom Schwein, da vom Gastrointestinaltrakt eine relativ hohe Apoptoserate bekannt ist.

4% Paraformaldehyd Fixierung	15 Min.
Waschen in PBS	3 x 5 Min.
Essigsäure/ Ethanol 1:2	5 Min.
Waschen in PBS	3 x 5 Min.
DNase Puffer nur Positivkontrolle	10 Min.



Waschen in PBS	3 x 5 Min.
Äquilibriumspuffer 1 Trpf. pro Schnitt	20 Sek.
Äquilibriumspuffer abtropfen lassen	
TdT Enzym auftragen und mit Plastik abdecken 37°C	90 Min.
Auftrag von Stop and wash Puffer, Schnitte bewegen	15 Sek.
Auftrag von Stop and wash Puffer	10 Min.
Waschen in PBS	3 x 5 Min.
Anti-Digoxigenin Fluorescein	30 Min.
Waschen in PBS	3 x 5 Min.
Hoechst 33342 Kernfärbung 1:1000	30 Min.

Zusammensetzung des DNase Puffers:

22,5 ml Aqua dest.; 13,3 ml Na-Cacodylat 420 mM; 4,0 ml Tris Puffer 300 mM pH 7,2; 160 µl MgCl<sub>2</sub>, 40 µl DDT; 5 µl DNase

## 2.5. Quantitative morphometrische Verfahren

Bei den im folgenden beschriebenen Versuchsreihen wurden die Bezeichnungen der einzelnen Tierpräparate im Sinne einer Blindstudie für den Untersuchenden unkenntlich gemacht, um sie erst nach erfolgter Auswertung wieder zuzuordnen.

An morphometrischen Methoden wurde angewandt:

- Auszählen von positiv markierten Zellen pro Gesichtsfeld (CD 45, Apoptose)
- Bestimmung der Oberflächendichte (hier Kapillardichte und Myozytendichte), wie nach der Zählregel von Gundersen beschrieben ist (rechter und oberer Einschlußrand wurden nicht mitgezählt)
- Bestimmung der Volumendichte von Elementen durch das von Weibel beschriebene Punktzählverfahren mithilfe eines überlagernden Zählgitters (Kollagen)

Die Punktzählmethode geht zurück auf das Prinzip von Delesse und nutzt den Umstand, daß der Mittelwert der Volumenfraktion eines Objektes bei ausreichender Anzahl von Schnitten durch das interessierende Objekt proportional dem Mittelwert der Flächenfraktion in Schnitten durch das Objekt ist. Die Methode findet hier für die Bestimmung des Anteiles an Kollagen Anwendung. Als Maß ergibt sich hier die Volumendichte für die entsprechende Substanz bezogen auf das Referenzvolumen  $V_{\text{koll}}/V_{\text{Gewebe}}$ . Die Volumendichte der hier interessierenden Struktur (Kollagenfaser) konnte mithilfe eines in das Okular eingebrachten Testgitters durch zählen derjenigen Kreuzungspunkte des Testgitters, die sich mit der

untersuchten Struktur trafen, ermittelt werden. Die Angaben erfolgen in Prozent. Die Formel  $V = A$  ( $V$  = Volumendichte,  $A$  = Anzahl der Trefferpunkte) findet auch für die hier betrachteten anisotropen (räumlich in einer Vorzugsrichtung ausgerichteten) Strukturen Anwendung<sup>9</sup>. Die Resultate dieser Versuchsreihen finden sich in Form von Diagrammen im Ergebnisteil.

### **2.5.1. Morphologische Beurteilung und allgemeine Beurteilung**

Vor der Anwendung von Immunfluoreszenzmethoden wurde von jedem Herzen ein HE gefärbter Transversalschnitt unter Durchlicht betrachtet. Die Schnitte wurden allgemein beurteilt und auch Artefakte, wie z.B. durch das Einfrieren verursacht, ausgeschlossen.

### **2.5.2. Bestimmung der Volumendichte von Kollagen Punktzählverfahren / Siriusrotfärbung**

Als etablierte Standardmethode zur Bestimmung des Anteils an kollagenen Fasern führten wir eine Färbung mit Sirius Red F3BA nach Sweat et al. 1964 (Chroma-Gesellschaft, Schmid GmbH + Co D-7316 Köngen) in 0,1% Pikrinsäurelösung an den Kryostatschnitten durch und zählten mithilfe der Punktzählmethode nach Weibel an einem Schnitt pro Präparat in 23 Gesichtsfeldern durch Überlagerung mit einem Testgitter von 121 Punkten (tatsächliche Größe:  $5 \times 5 \mu\text{m} = 25 \mu\text{m}^2$ ) diejenigen Kreuzungspunkte des Zählgitters aus, die sich mit den rot gefärbten Kollagenfibrillen trafen. Das Aufsuchen der Gesichtsfelder geschah nach vorher definiertem mäanderförmigem Bewegungsmuster des Kreutisches. Die gezielt schematische, zufallsorientierte Auswahl des Gesichtsfeldes sollte so subjektive Kriterien des Untersuchenden ausschalten helfen. Gefäße mit perivaskulärer Fibrose wurden ausgeschlossen.

### **2.5.3. Bestimmung der Myozytenbreite / Vinculinfärbung**

Die Bestimmung der Myozytenbreite erfolgte an einem Mikroskop der Firma Leitz bei einer Vergrößerung von 1x5x50 (Ölimmersionsobjektiv).

In längs getroffenen Myozytenschnitten, die sich aufgrund der Binnenarchitektur bei einem Transversalschnitt vor allem in der Mitte der Herzwand finden, erscheinen die Disci intercalares nach Markierung mit Vinculin-Antikörpern dann im Idealfall als gerader Strich oder als treppenförmige Linie. Die Länge dieser Linie wurde mit einer im Okular befindlichen Meßlatte der Fa. Leitz bestimmt, deren

Maßeinheiten mit einer zweiten als Objektträger erhältlichen Meßplatte auf dem Objektisch geeicht worden war. Es wurden an einem Schnitt jeweils 31 Myozyten vermessen, wenn die zusätzliche Bedingung erfüllt war, daß ein Kern dieses Myozyten (Kernfärbung mit Propidiumjodid) erkennbar war. Da sich die Kerne von Kardiomyozyten verglichen mit einem stark vereinfachten dreidimensionalen Modell in der Mitte eines Zylinders befinden, sollte so sichergestellt werden, daß bei Schnitten die Medianebene getroffen worden war. Sieht man sich jedoch frisch isolierte Kardiomyozyten unter dem Mikroskop an, so erkennt man, daß diese geometrische Annahme sehr vergrößernd ist. Aus den Messungen wurde dann ein Mittelwert pro Tier und pro Versuchsgruppe gebildet.

#### **2.5.4. Bestimmung der Kapillardichte und Myozytendichte Ec-NOS Markierung**

Als Mikroskop diente auch hier das Leitz Aristoplan. Die Vergrößerung lag bei:  $1 \times 5 \times 63$ . Als Bildausschnitt diente ein ins Okular eingebrachtes Quadrat mit einer tatsächlichen Oberfläche von  $160 \mu\text{m} \times 160 \mu\text{m} = 0,0256 \text{ mm}^2$ . Diese wurde durch den Vergleich mit einer Meßskala, die sich auf einem Objektträger befindet, ermittelt. Zur Auszählung wurden die innerhalb des Quadrates liegenden Kapillaranschnitte und Myozytenanschnitte anhand der Zählregel nach Gundersen (1977) eingeschlossen, solche, die vom rechten oder unteren Rasterrand geschnitten wurden ausgeschlossen, solche, die den oberen oder linken Rand schnitten mitgezählt (Einschlußrand). Die Werte wurden mit dem Faktor 39,06 multipliziert und ergaben somit  $[\text{n/mm}^2]$ . Bei der Bestimmung der Kapillar- und Myozytendichte wurden pro Präparat 7 Gesichtsfelder ausgezählt.

Für die Auszählung der Kapillaren wurden nur transversal angeschnittene Areale benutzt, da die Kapillaren dann als runde Struktur erscheinen.

Zusätzlich wurde jeweils im gleichen Gesichtsfeld, in dem die Kapillaranschnitte gezählt worden waren, die Anzahl der Myozyten pro Quadrat gezählt, so daß sich anschließend ein Quotient aus den ermittelten Werten bilden ließ, der das Verhältnis von Kapillaren zu Myozyten ausdrückte.

#### **2.5.5. Bestimmung von CD 45 positiven Zellen**

Das Antigen CD 45 wird als Panleukozyten-Marker benutzt. Es findet sich sowohl auf T-, wie auch auf B-Lymphozyten, Monozyten, großen granulären Leukozyten, wie auch polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten und wurde hier eingesetzt, um im gesamten Gewebeschnitt die Anzahl positiver Zellen dieser

Zellreihen pro Gesichtsfeld zu zählen. Die Größe des Gesichtsfeldes betrug hier bei Verwendung eines 40er Objektivs  $0,28 \text{ mm}^2$ . Als Nebenbeobachtungspunkt wurde bei der Auszählung der positiven Zellen eines Gesichtsfeldes beachtet, ob sich eine perivaskuläre Häufung von CD 45 positiven Zellen finden ließ.

Auswahlkriterium für ein Gefäß und somit definiert als perivaskulär war eine Größe des Gefäßes zwischen 0,02 mm und 0,18 mm Durchmesser. Die Zählung der positiven Zellen ergab in Vorversuchen eine hinreichende Genauigkeit, wenn 31 Gesichtsfelder ausgezählt wurden.

### **2.5.6. Bestimmung apoptotischer Zellen**

Die Größe des Gesichtsfeldes und die Zählmethode war mit der oben beschriebenen vergleichbar. Als jeweilige Bezugsgröße diente die mittlere Gesamtzahl der Kerne pro Gesichtsfeld. Die Tatsache, daß die meisten Myozyten der Ratte zwei Kerne besitzen kommt hier nicht als Störfaktor zum Tragen, da diese, wie an frischen isolierten Rattenmyozyten zu sehen ist, sich jeweils im äußeren Drittel der Myozyten befinden, also die eindeutige Zuordnung in einem Schnitt von  $4\mu\text{m}$  nicht stören.

### **2.5.7. Bestimmung aFGF positiver Zellen und TGF- $\beta$ positiver Zellen**

Nach entsprechender Markierung wurden die Schnitte der verschiedenen Altersgruppen auf positiv markierte Zellen durchgemustert.

## **2.6. Statistische Methoden**

Aus den gemittelten Meßwerten von Tieren gleichen Stammes und gleichen Alters wurde ein Mittelwert für die jeweilige Altersgruppe gebildet. Die Anzahl  $n$  der Tiere war entweder 3 oder 4. Zur weiteren Berechnung diente die Statistiksoftware SigmaStat für Windows Version 2.0 der Jandel Corporation. Um zu überprüfen ob sich signifikante Unterschiede bei den Mittelwerten der altersentsprechenden Gruppen von WKY und SHR ergaben wurde der Paired T-Test angewendet.

Für die Überprüfung von signifikanten Unterschieden innerhalb des jeweiligen Stammes von WKY und SHR bei den trainierten und untrainierten Tieren wurde die Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) herangezogen. Vergleiche mithilfe der Bonferroni Methode bzw. der Kruskal-Wallis Test und multiple Vergleiche nach Dunn schlossen sich teils an.



## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Statistische Ergebnisse**

Nach der Anwendung des paired t-Tests ergaben sich jeweils beim Vergleich der Parameter, Fibrose, Myozyten-, und Kapillardichte zu den altersgleichen Kontrollgruppen von WKY keine statistisch signifikanten Unterschiede. Das Gleiche galt für die trainierten im Vergleich zu den untrainierten Tieren.

Bei der Gegenüberstellung von Altersgruppen der WKY mit der hier als Kontrollgruppe bezeichneten 22 Monate alten Gruppe gleichen Stammes fanden sich allerdings signifikante Unterschiede. Diese sind in den folgenden Ergebnisdiagrammen durch waagrechte Balken oder Sterne besonders hervorgehoben.

### **3.2. Qualitative Beurteilung**

Auffallend waren bei adulten (über 14 Monate alten) Tieren Ansammlungen von Zellen, die als Nichtmyozyten erkennbar waren und sich lokal sowie zum Teil perivaskulär im Myokard im Bereich verstärkter Fibrose finden ließen. Diese Zellansammlungen konnten mit einer gesondert durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Vimentin (Fa.Dianova Immunotech Hamburg) als erstem Antikörper als mesenchymale Zellen identifiziert werden, hier am ehesten Fibroblasten, da Vimentin als zytoskelettäres Protein hier vorkommt, in anderen Zellen des Myokards jedoch nicht exprimiert wird.

Bei jungen Tieren von 9 Wochen und 15 Wochen beider Stämme zeigten sich hier keinerlei Anzeichen für eine fokale Fibrose.

Bei den Gruppen beider Stämme, die 14 Monate alt geworden waren, außer zwei WKY Ratten und einer Spontan Hypertensiven Ratte war jeweils fokale Fibrose im Myokard zu erkennen, die in der Vimentin-Markierung mit einem deutlichen Fluoreszenzsignal einherging, als Zeichen dafür, daß hier auch gleichzeitig Fibroblasten in einer Anhäufung vorlagen.

Zusammengefaßt konnte für diese Altersgruppe der adulten Tiere gesagt werden, daß sich die Anzahl der fibrotischen Areale oder deren Fläche nach planimetrischer Bestimmung in einem kleinen Pilotversuch bei den WKY Ratten nicht wesentlich von denen der Spontan Hypertensiven Ratten unterschied. Vom Verteilungstyp der fibrotischen Areale waren bei beiden Stämmen im wesentlichen wenige subendokardiale Bezirke aber auch tiefere intramurale Bezirke betroffen, teils aber

auch wenige perivaskuläre Infiltrate erkennbar. Eine höhere Anzahl fibrotischer Areale bei den Spontan Hypertensiven Ratten oder ein deutlich größeres Gebiet von Infiltraten war nicht erkennbar.

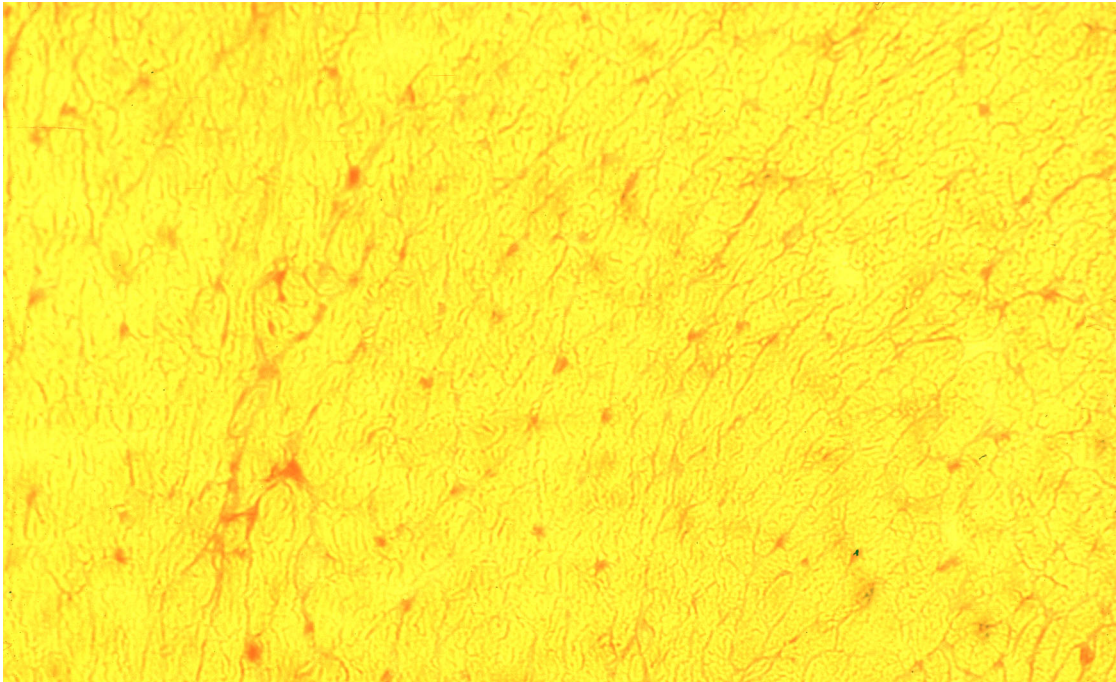
Die Siriusrotfärbung ergibt bei jungen und adulten Tieren ein feines retikuläres Netzwerk, das die Kardiomyozyten umgibt. Nur sehr vereinzelt zeigen sich interstitiell Regionen, die stärker von Kollagen durchsetzt sind. Bei seneszenten Tieren dagegen liegen hier dagegen interstitielle Strukturen mit welligem Verlauf vor und drängen den Verband der Kardiomyozyten förmlich auseinander. Große Gefäße und perivaskuläre Bezirke färben sich auch entsprechend ihrem Bindegewebsgehalt intensiv an. Die Angaben erfolgen in Prozent [%]  $V_{\text{koll}}/V_{\text{Gewebe}}$ .

### **3.3. Histo- und Immunhistochemie**

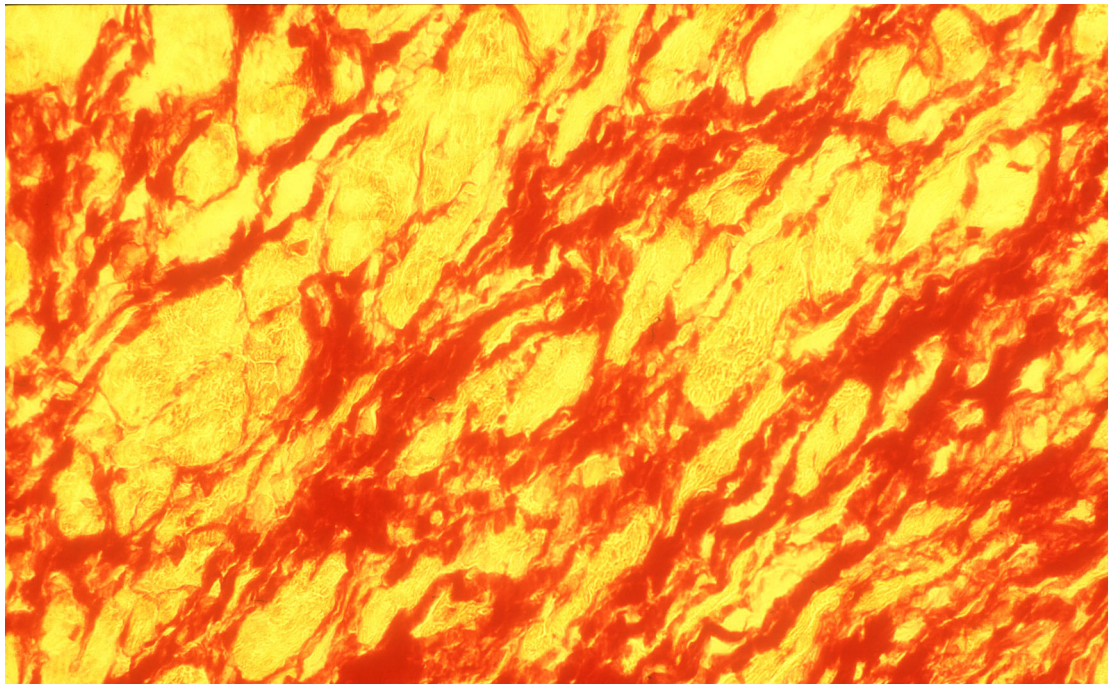
#### **3.3.1. Bestimmung der Volumendichte an Kollagen**

Man erkennt beim jungen Tier das feine retikuläre Muster der Kollagenfärbung. Regionen mit vermehrter interstitieller Ansammlung des Farbproduktes finden sich hier noch nicht.

Die Kardiomyozyten werden bei dem seneszenten Tier durch die Kollagenfibrillen auseinandergedrängt. Der Zusammenhalt des kontraktiles Materiales wird hierdurch gestört.



*Abb. 1: Siriusrot Färbung, SHR 9 Wochen, Vergrößerung 1x5x40*



*Abb. 2: Siriusrot Färbung, SHR 22 Monate, Vergrößerung 1x5x40*



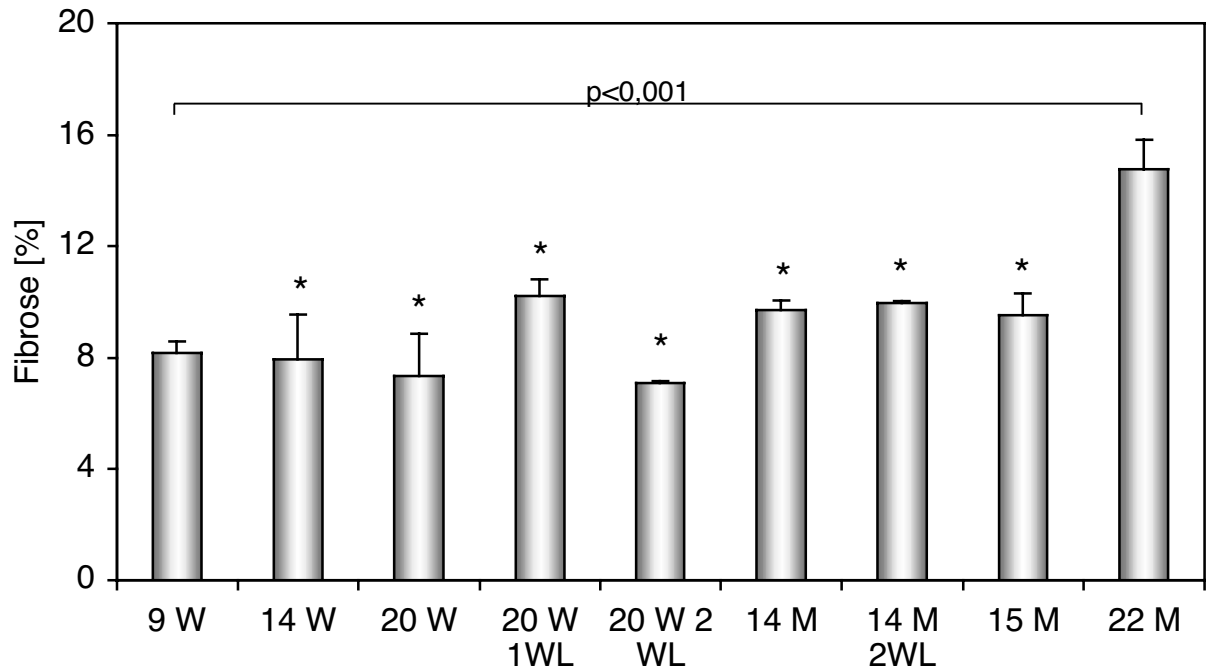


Abb. 3: WKY-Kontrollgruppen: Fibrose

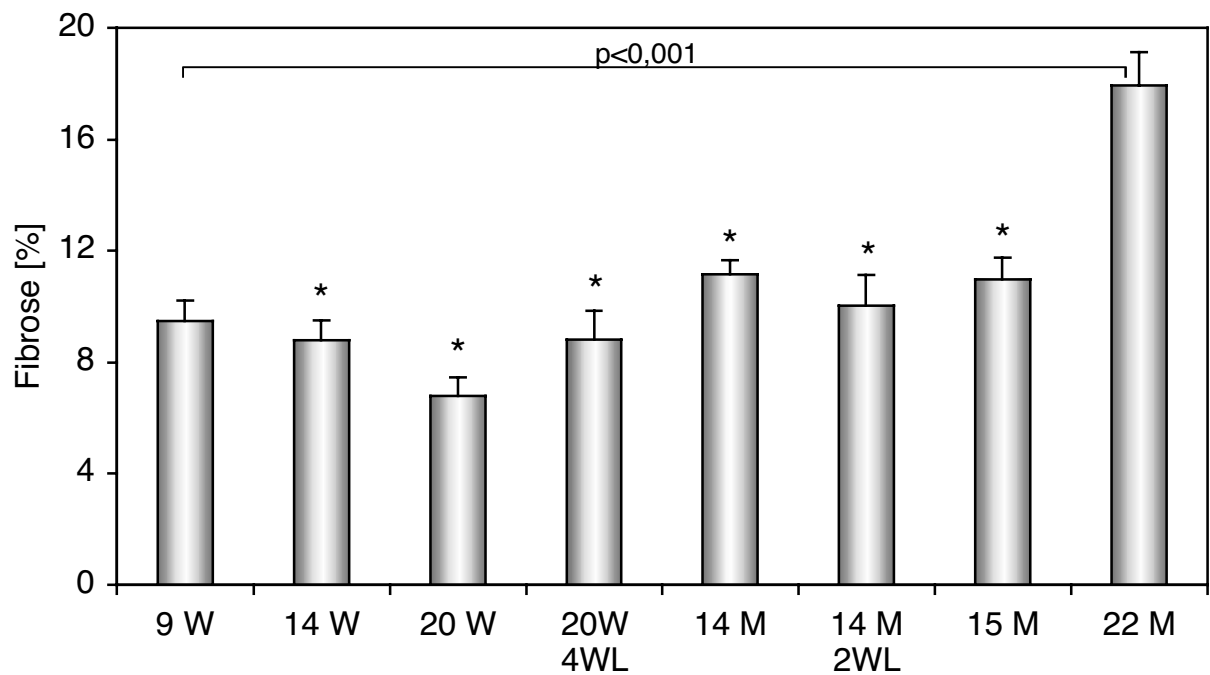


Abb. 4: SHR-Gruppen: Fibrose

### 3.3.2. Bestimmung der Myozytenbreite

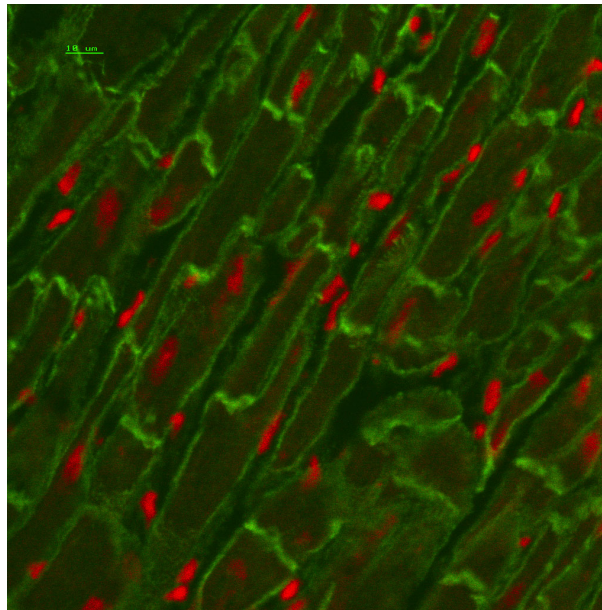


Abb. 5: Vinkulinmarkierung, SHR 9 Wochen. Die Kardiomyozyten stellen sich im Längsschnitt als dicht an dicht gelagertes schindelförmiges Muster mit relativ homogener Breite dar. Neben den Glanzstreifen ist auch das seitliche Sarkolemm markiert. Die teilweise mitangeschnittenen Kerne erscheinen nach Markierung durch Propidiumjodid rot. (Maßstab entspricht jeweils 10 µm)

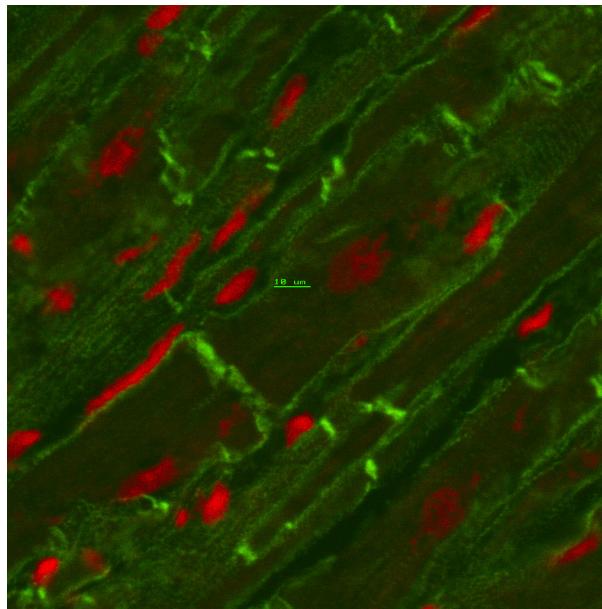


Abb. 6: Vinkulinmarkierung, SHR 22 Monate. Es ist eine deutlich inhomogenere Verteilung der Myozytenbreite im Vergleich zum jungen Tier erkennbar. Die Glanzstreifen erreichen z.T. die doppelte Breite und erscheinen vermehrt „treppenförmig“.

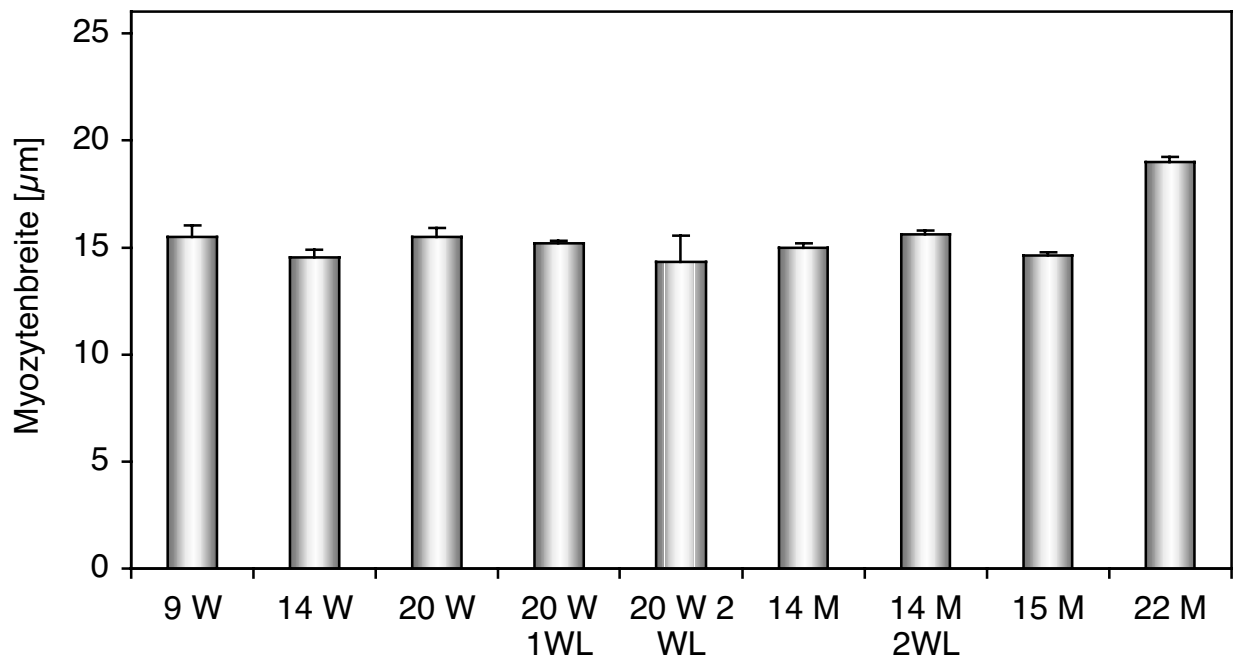


Abb. 7: WKY-Kontrollgruppen: Myozytenbreite

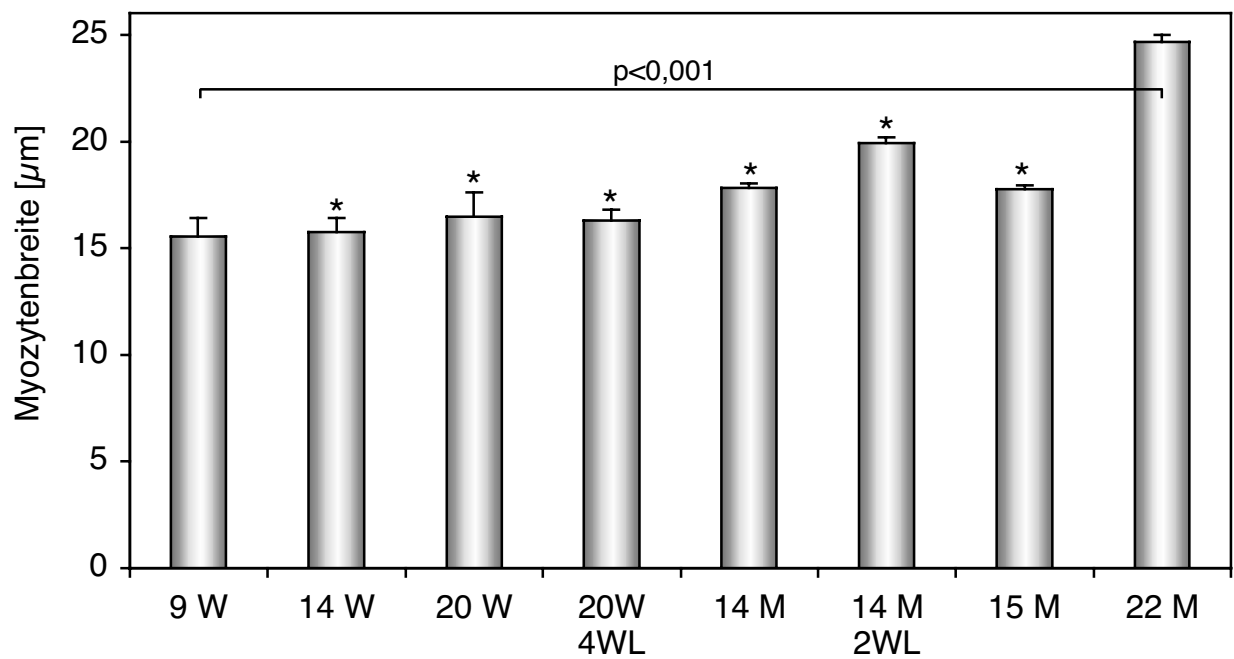
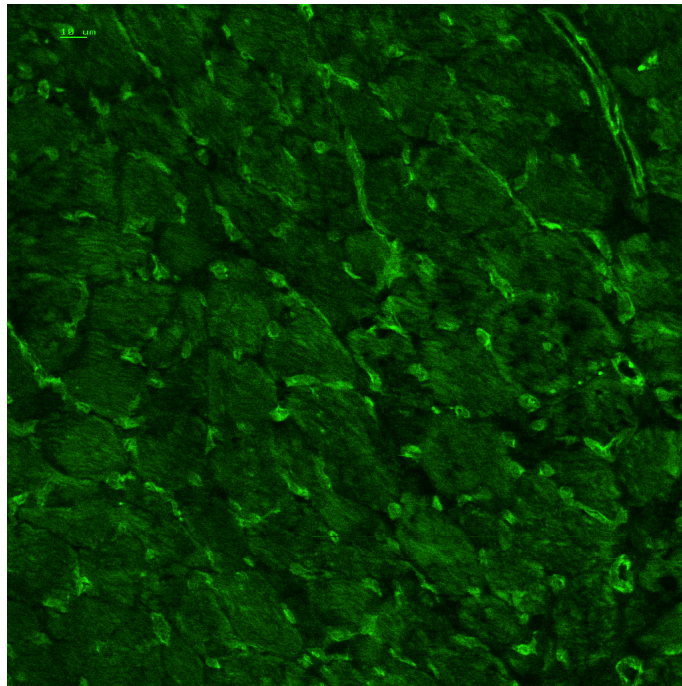
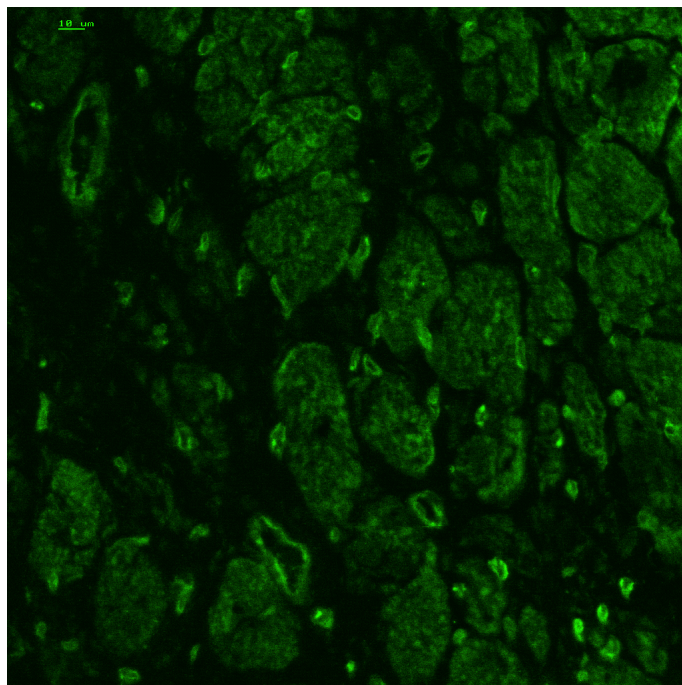


Abb. 8: SHR-Gruppen: Myozytenbreite

### 3.3.3. Bestimmung der Kapillardichte



*Abb. 9: EC-NOS Markierung hier SHR 9 Wochen. In diesem Beispiel sieht man die mit EC-NOS markierten beim jungen Tier reichlich erscheinenden Kapillaren mit wenig Bindegewebe. Rechts oben ist ein Gefäß längs angeschnitten.*



*Abb. 10: EC-NOS Markierung hier SHR 22 Monate. Der Gewebeverband ist nicht mehr so dicht gepackt, wie beim jungen Tier. Quer-schnitte von Kapillaren sind seltener zu sehen.*

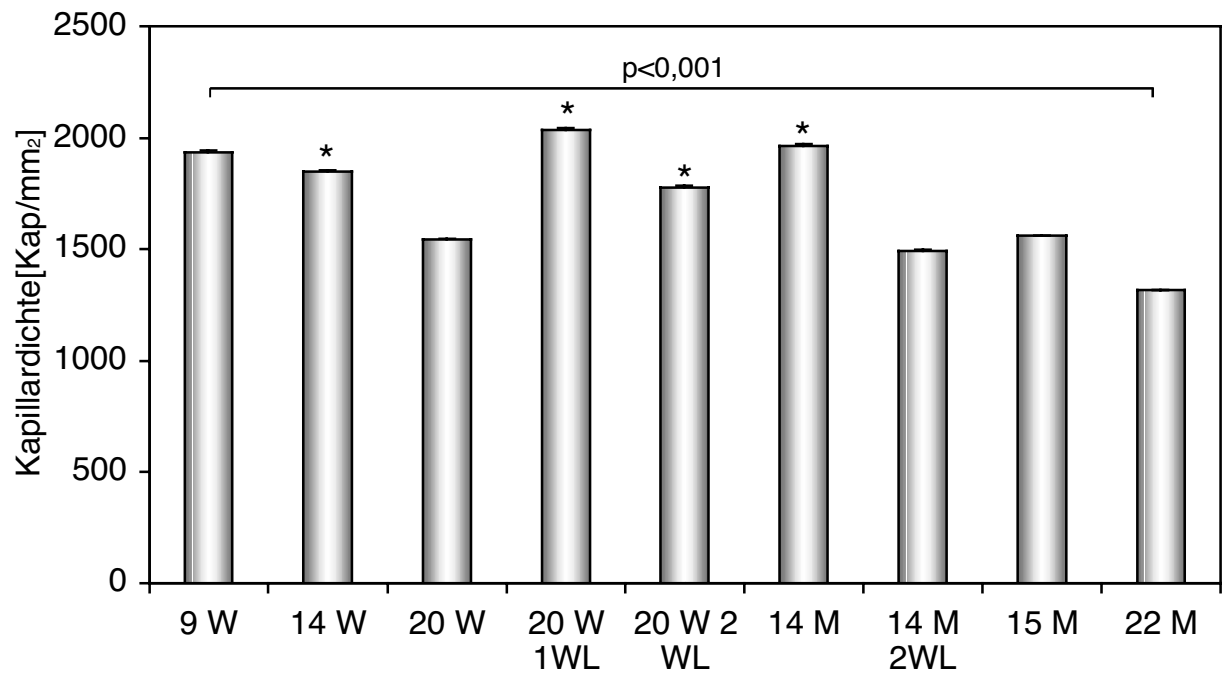


Abb. 11: WKY-Kontrollgruppen: Kapillardichte

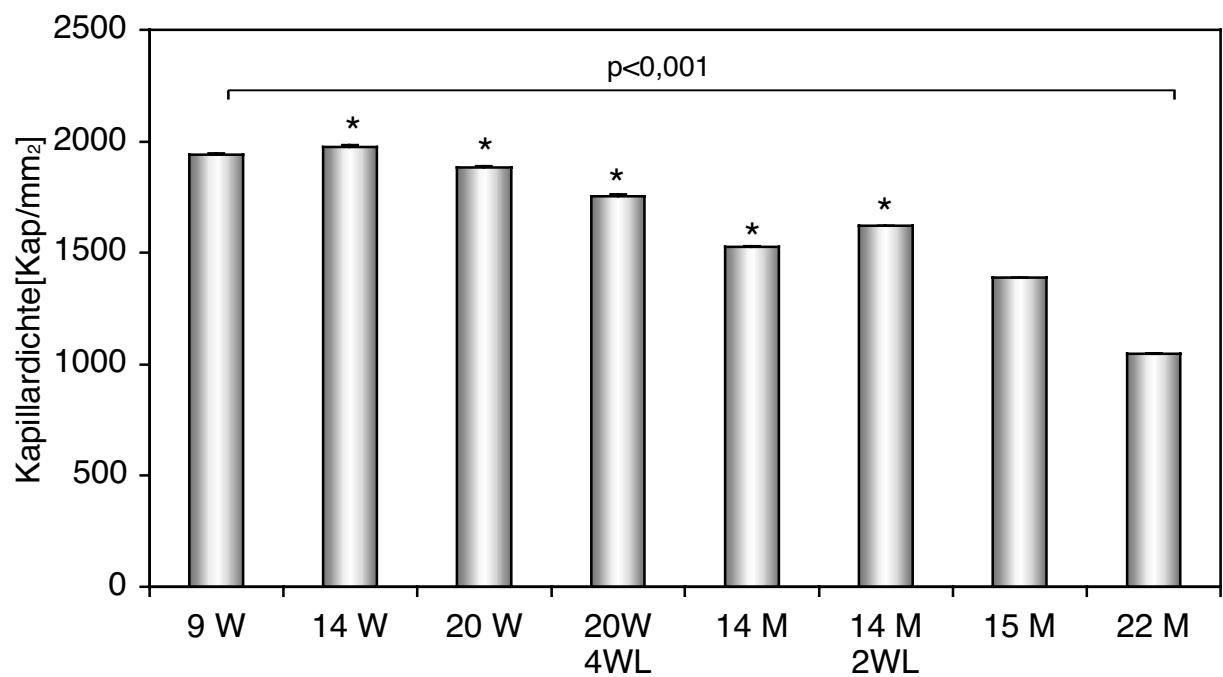


Abb. 12: SHR-Gruppen: Kapillardichte

### 3.3.4. Bestimmung der Myozytendichte

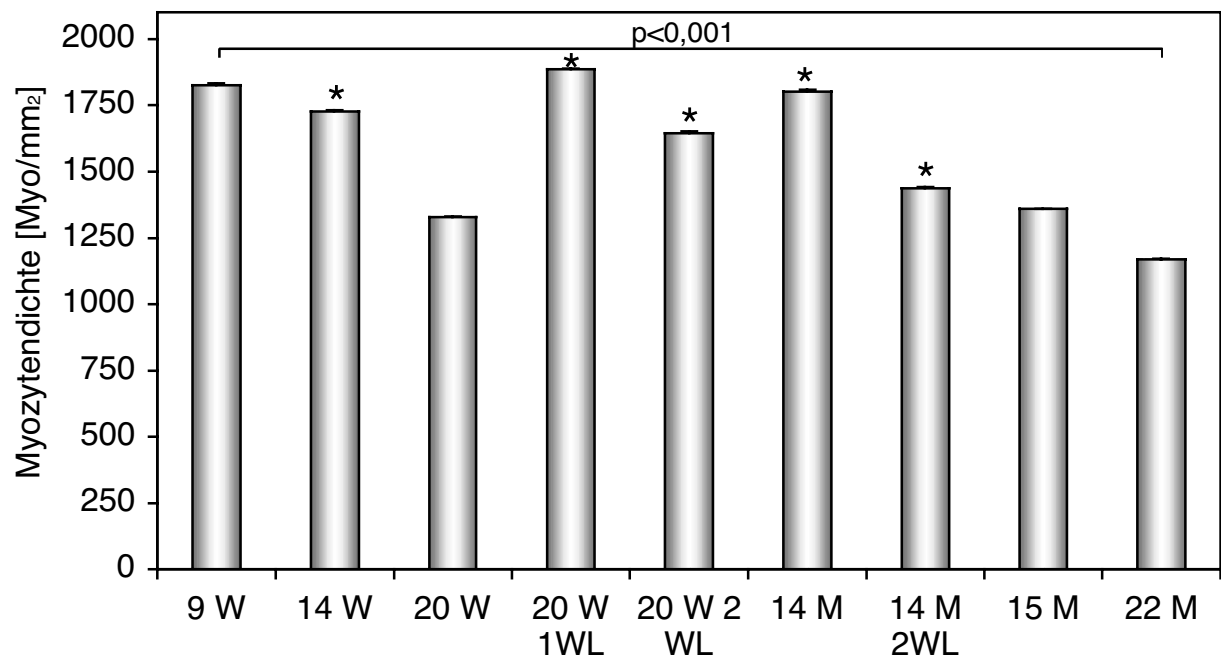


Abb. 13: WKY-Kontrollgruppen: Myozytendichte

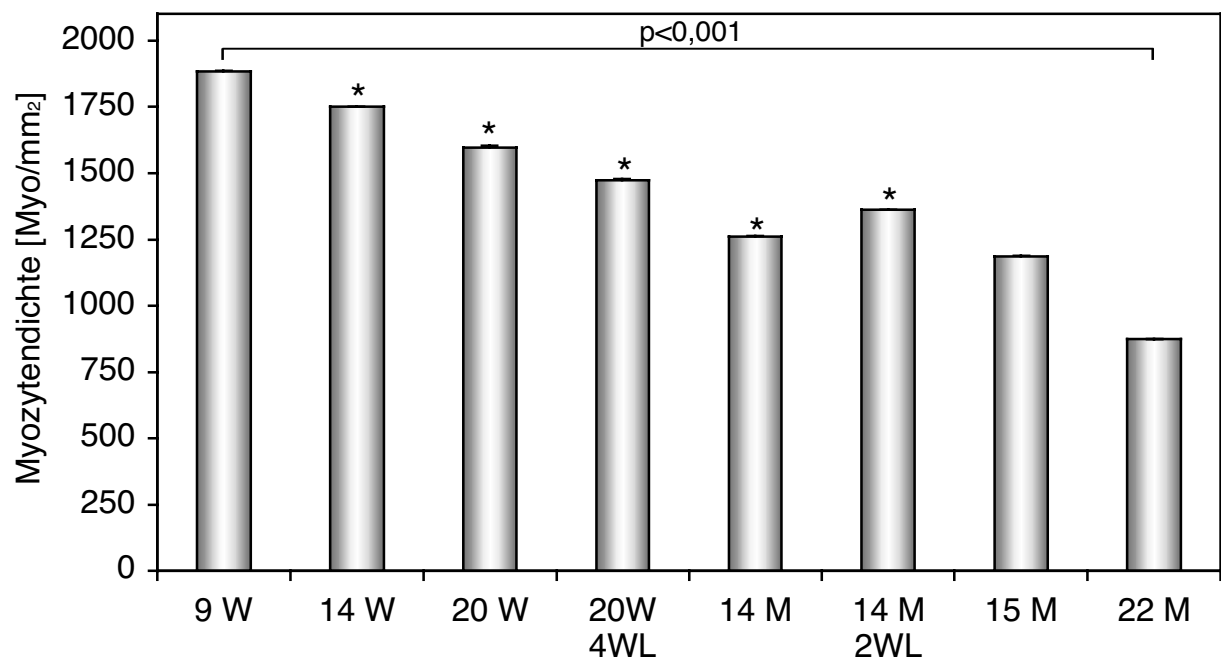


Abb. 14: SHR-Gruppen: Myozytendichte

### 3.3.5. Verhältnis Kapillardichte/Myozytendichte

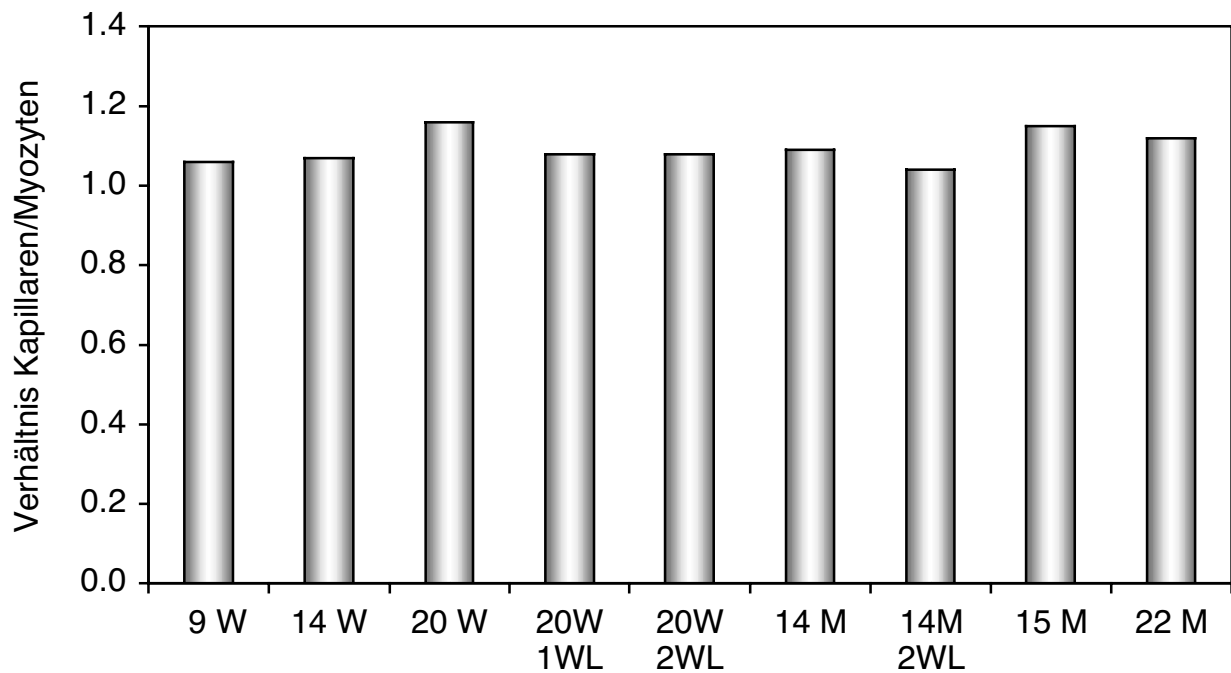


Abb. 15: WKY-Kontrollgruppen: Verhältnis Kapillardichte / Myozytendichte

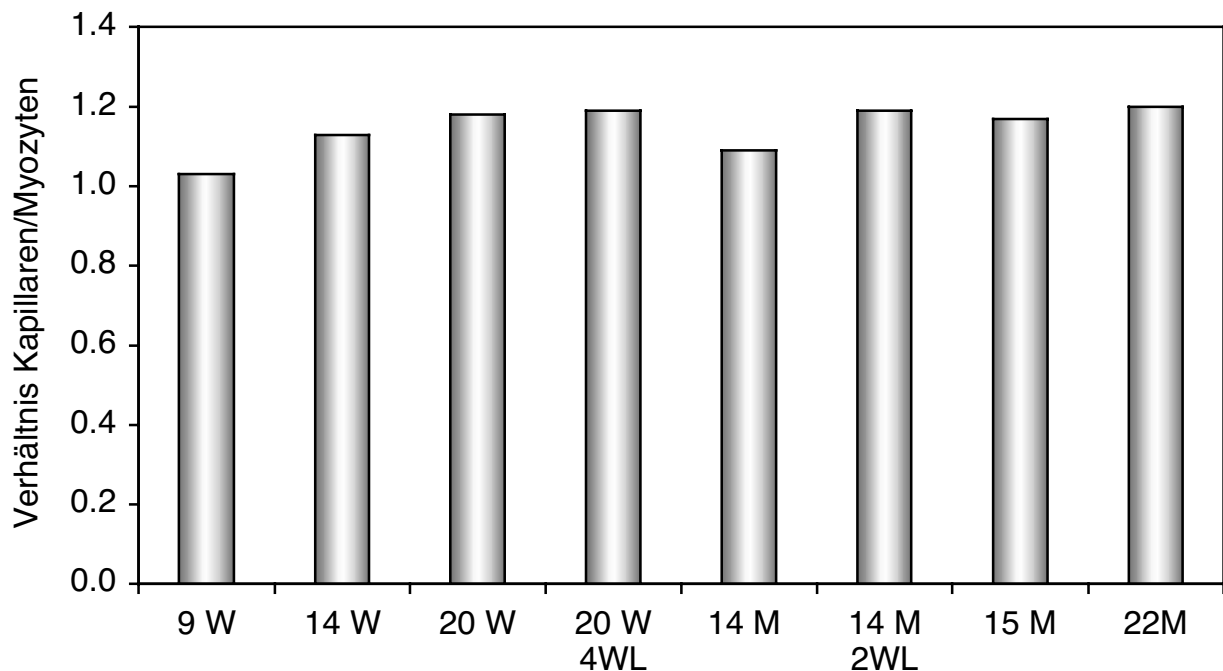
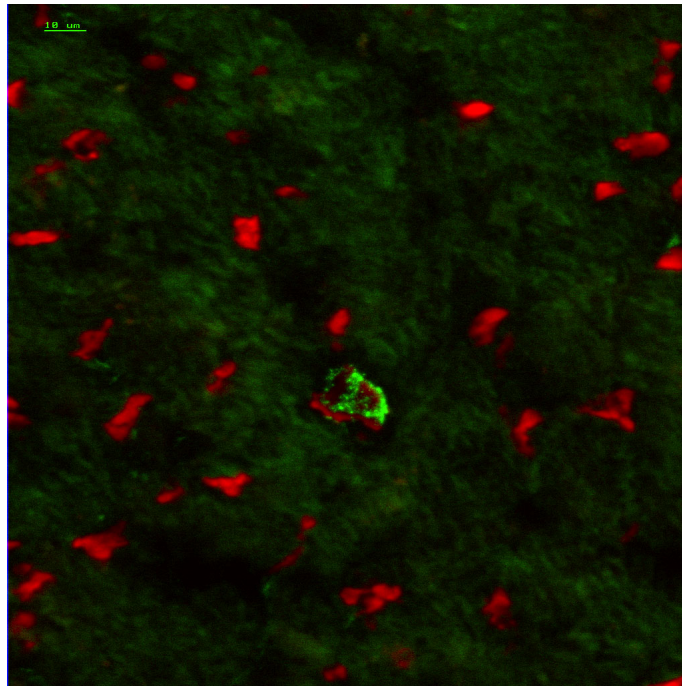


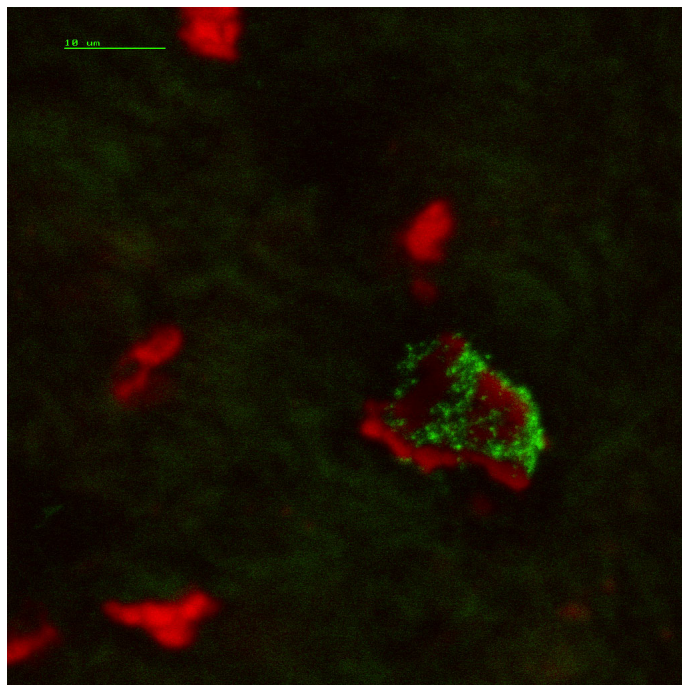
Abb. 16: SHR-Gruppen: Verhältnis Kapillardichte / Myozytendichte



### 3.3.6. Bestimmung von CD 45 positiven Zellen



*Abb.17: CD 45 positive Zelle. Spezifisch markierter Leukozyt umgeben von Kardiomyozyten mit schwacher unspezifischer Fluoreszenz bei Aufnahme mit dem Laser Scanning Mikroskop.*



*Abb. 18: gleiche CD 45 positive Zelle wie oben in stärkerer Vergrößerung*



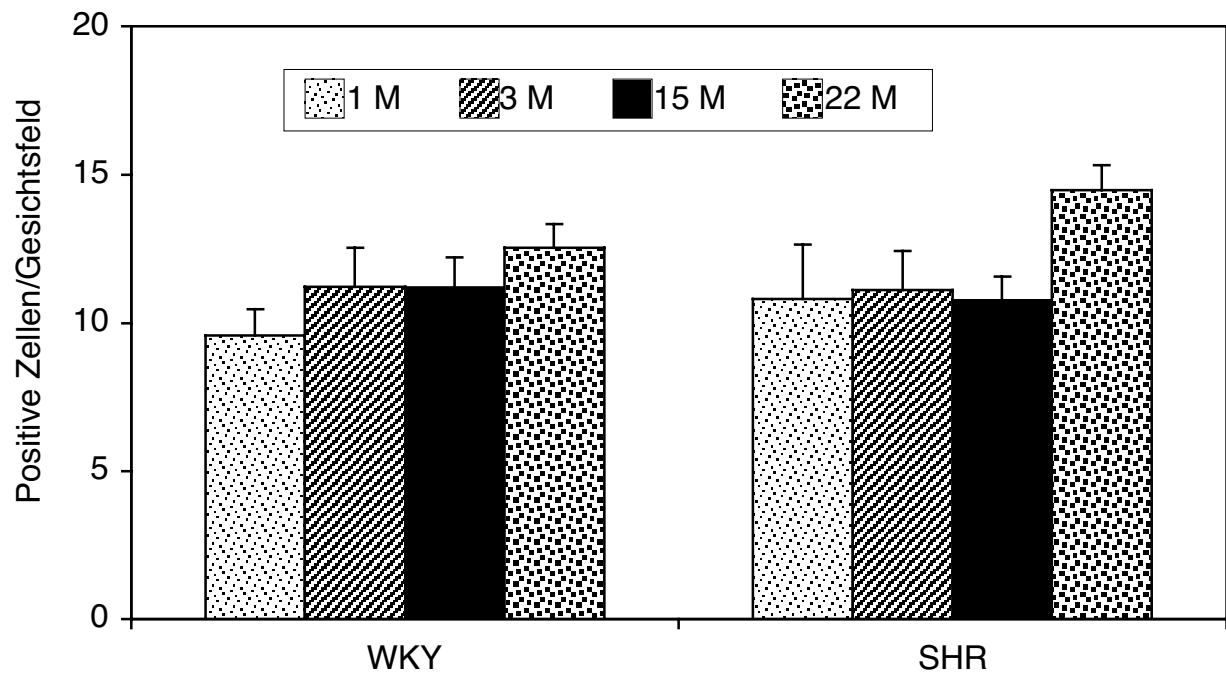


Abb. 19: CD45 positive Zellen

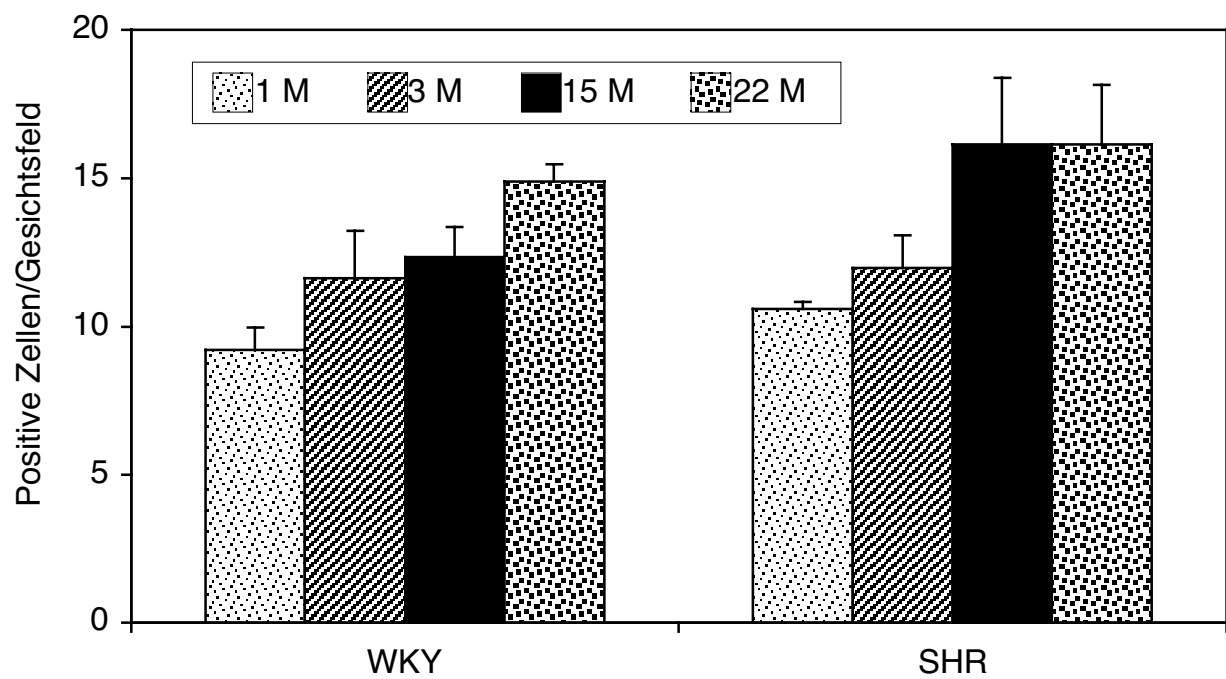
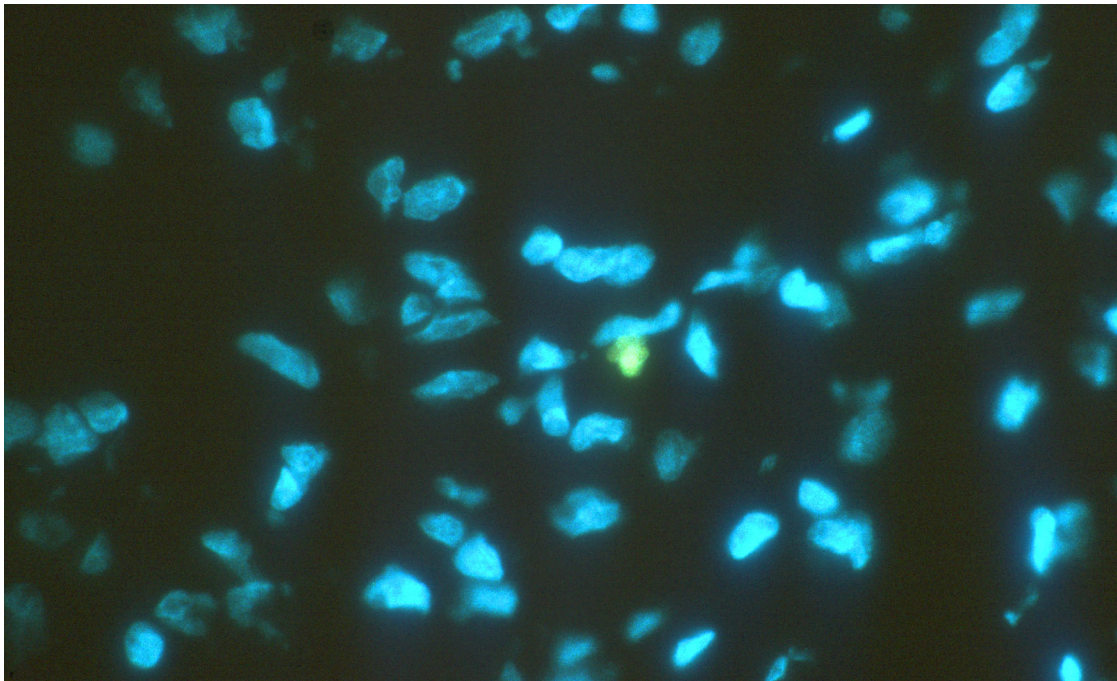


Abb. 20: Perivaskuläre CD45 positive Zellen

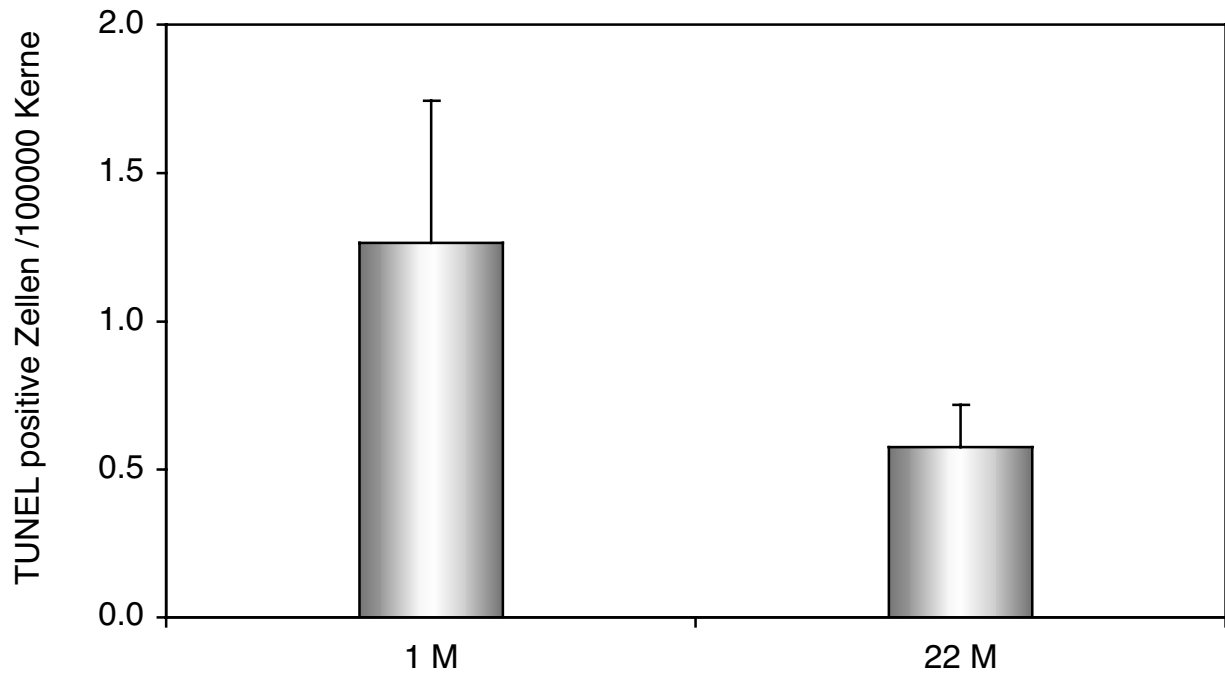
### 3.3.7. Bestimmung apoptotischer Zellen

Nach Anwendung des Fluorescein-Apoptose Protokolls stellen sich Kerne, die DNA-Strangbrüche zeigen, mit einer grünen Fluoreszenz dar. Zur besseren Identifizierung wurde als Kernfarbstoff zusätzlich Hoechst 33342 angewendet, der die Kerne deutlich blau erscheinen läßt. Problematisch war hier bei seneszenten Tieren, daß sich der deutlich höhere Lipofuszinanteil störend auf die Erkennbarkeit des Apoptosesignals auswirkte.

Gewißheit ließ sich manchmal nur herstellen, wenn man sowohl den Blaufilter als auch den Grün- und Rotfilter zur Beurteilung des gleichen Gesichtsfeldes heranzog. Trotz intensiver Suche ließen sich keine positiv also grün markierten Kerne identifizieren, die sich innerhalb von Myozyten befanden, so daß die Rate apoptotischer Myozyten auch des alternden Herzens der Ratte als sehr niedrig eingeschätzt werden muß. Nicht so selten waren dagegen die im Interstitium markierten apoptotischen Zellen, die hier bei jungen SHR im Vergleich zu seneszenten ausgezählt wurden. Es handelt sich hier sicherlich um eine heterogene Gruppe von Zellen wie Fibrozyten, Fibroblasten, sowie gewebeständigen Makrophagen und wandernden Granulozyten.



*Abb. 21: TUNEL positive Markierung. Apoptotische Kerne von Zellen erscheinen intensiv grün.*

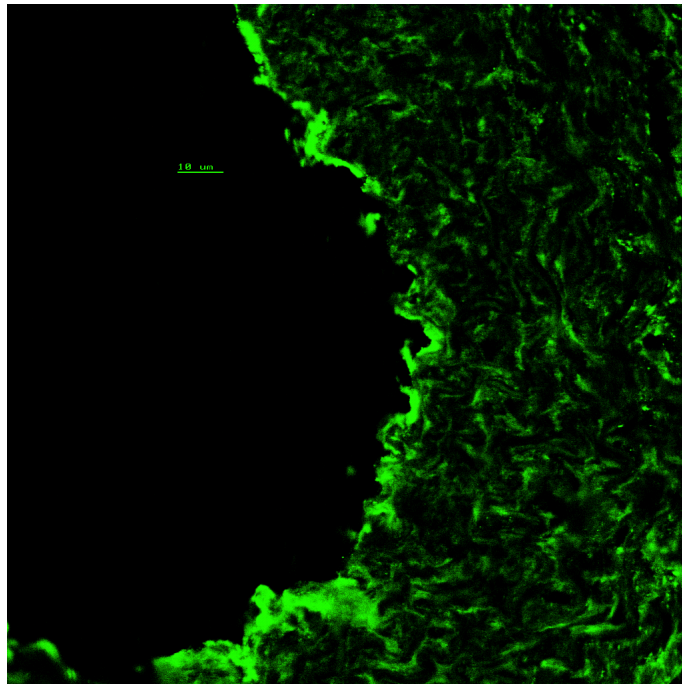


*Abb. 22: TUNEL positive Markierung. Die Gruppe der jüngsten SHR zeigte zwar im Vergleich zur ältesten einen Unterschied, dieser war jedoch nicht signifikant.*

### 3.3.8. Bestimmung von ACE positiven Arealen

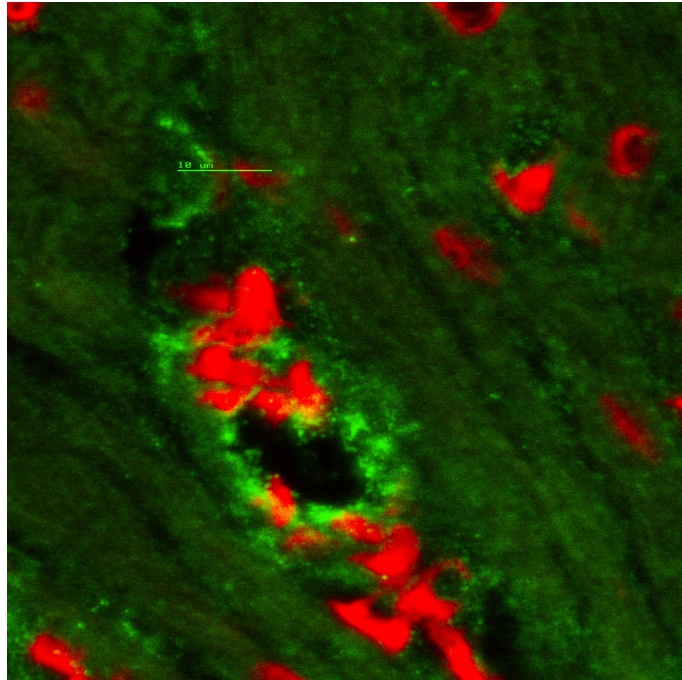
Die Markierung von Angiotensin-Converting Enzym zeigte sich als Fluoreszenz am Endothel von großen Gefäßen des Herzens. Dies stellt sich als dünne Linie dar. Allerdings waren nicht alle großen Gefäße markiert. Daneben fanden sich rechtsventrikulär Areale mit positiver Markierung. Im Myokard des linken Ventrikels war nur hin und wieder eine spärliche positive Markierung zu finden. Es fanden sich hinsichtlich der unterschiedlichen Gruppen und verwendeten Tierstämme fluoreszenzmikroskopisch keine Unterschiede.

Eine weitere Lokalisation des ACE Signales war das Endothel der großen Gefäße rechts- und linksventrikulär.



*Abb. 23. ACE Markierung*

Angiotensin Converting Enzym ließ sich am rechtsventrikulären Endothel und Myokard als Signal erkennen. Das Endothel des li. Ventrikels war hingegen nicht in gleicher Weise markiert.



*Abb. 24: ACE Markierung*



### 3.3.9. Bestimmung aFGF positiver Zellen

Die aFGF positiven Zellen waren insgesamt sowohl bei jungen wie auch bei sehr alten Tieren sehr selten zu finden, teils nur einmal pro Transversalschnitt anzutreffen. Eine Quantifizierung wurde daher nicht durchgeführt. Die Markierung befand sich meist auf interstitiell liegenden Zellen, selten auch auf Kardiomyozyten, wie Abb. 25 zeigt.

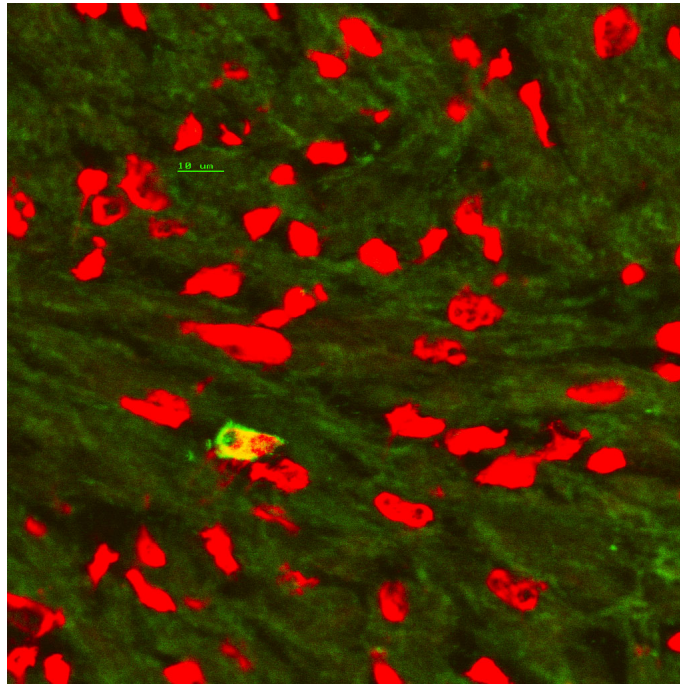


Abb. 25: *aFGF Laser Scanning Bild einer aFGF positiven Zelle im Interstitium des Myokards.*

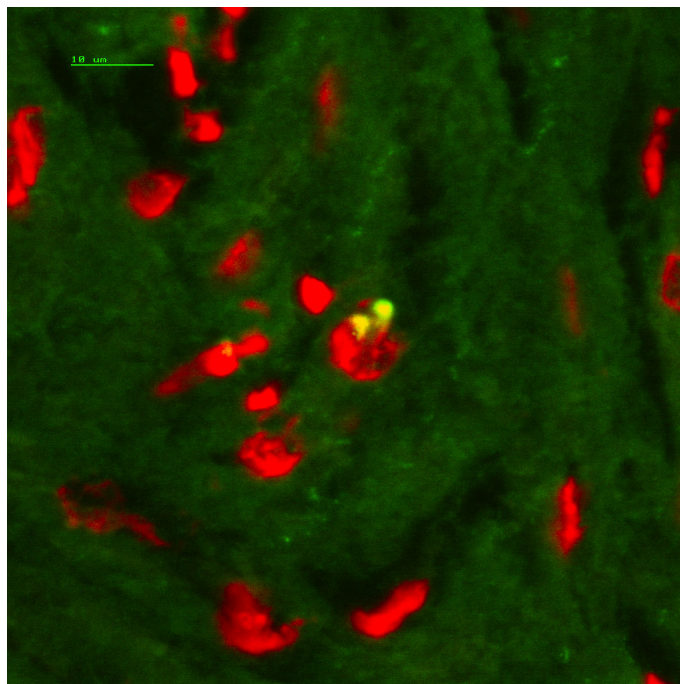
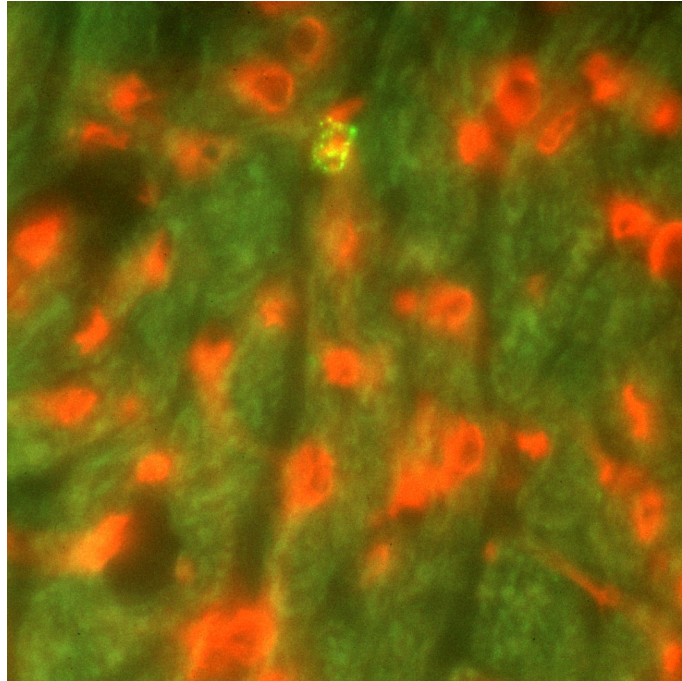


Abb. 26: *aFGF. Die Markierung war aber auch an Kardiomyozyten nachweisbar.*

### 3.3.10. Bestimmung TGF-beta positiver Zellen

Eine Fluoreszenzmarkierung fand sich auch hier nur an vereinzelt Zellen. Sie fielen durch ein feines leicht fleckiges Muster von Fluoreszenzpünktchen auf und trugen dies scheinbar auf der Außenmembran. Positive Zellen lagen immer interstitiell teils intravaskulär (Abb. 26)

Unmittelbare Nachbarschaftsbeziehungen zwischen positiven Zellen und fibrotischen Arealen waren hier nicht vorhanden, diese traten aber vereinzelt auf.



*Abb. 27: TGF- $\beta$  positive Zelle. Vergrößerung 1x5x100.*

### 3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die wichtigsten Resultate der Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Senescente (22 Monate alte) Ratten zeigen im Vergleich zu jungen und adulten Tieren eine signifikante Differenz im Grad der Fibrose. Dies gilt für die SHR ebenso wie für die Kontrollgruppe der WKY. Trainingsunterschiede sind anhand der statistischen Auswertung nicht deutlich zu erkennen. Auch bei der Kontrollgruppe von WKY ist es im Alter von 22 Monaten zu einer pathologischen Form von Fibrose mit vereinzelt stehenden Myozyten gekommen, die von Bindegewebe ummauert sind.
2. Die mittlere Myozytenbreite nimmt im erst im seneszenten Alter deutlich zu. Dieser Effekt ist bei den SHR stärker als bei WKY
3. Die relative Kapillardichte zeigt mit zunehmendem Alter für SHR und WKY eine deutliche Abnahme.
4. Die relative Myozytendichte nimmt ebenfalls mit zunehmendem Alter bei WKY und SHR deutlich ab.
5. Das Verhältnis der Kapillardichte/Myozytendichte, auch als Kapillar/Faserrelation bezeichnet, bewegt sich bei WKY und SHR um oder leicht über dem Wert von 1 : 1. Die Relation weist mit steigendem Alter tendenziell eher in Richtung einer relativen leichten Zunahme der Kapillardichte. Freilich steigt mit zunehmendem Myozytendurchmesser die Diffusionsstrecke, die das Blut von der Kapillare bis zum Funktionsgewebe zurücklegen muß. Für alle obengenannten Resultate gilt: Die altersgleichen Gruppen von WKY und SHR weisen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf, wie man dies vielleicht erwartet hätte. Die Änderung der Werte durch Trainingseffekte liegt in einem Bereich, der statistisch nicht signifikant unterschiedlich von nicht trainierten Tieren ist.  
Wir haben somit keinen Hinweis für eine echte Rarefizierung der Kapillaren im hypertrophen und alternden Herzen.
6. Die Zahl der mit CD 45 positiven Zellen im Rattenmyokard zeigt mit steigendem Alter eine Tendenz zur Zunahme. Jedoch erreicht diese Tendenz kein Niveau akzeptabler Signifikanz.  
Es läßt sich somit kein sicherer Hinweis auf ein entzündliches Geschehen im normalen oder Spontan hypertensiven alternden Rattenherzen ableiten.

7. Die Rate an apoptotischen Kernen von Myokardzellen ist als sehr niedrig einzuschätzen. Trotz ausgiebiger Suche fanden sich im Funktionsgewebe der SHR Ratten im jugendlichen (4 Wochen) wie auch im seneszenten Alter keine apoptotischen Kardiomyozytenkerne. Das Tier verstirbt nicht an einem zunehmenden Zelluntergang des Myokards. Die Gesamtzahl der apoptotischen Kerne im Gewebeschnitt, die sich durchweg im Interstitium befanden, nahm in der Tendenz bei seneszenten Tieren eher ab.
8. Die grundsätzliche immunhistochemische Verteilung von ACE positiven Arealen unterscheidet sich nicht wesentlich bei WKY und SHR. Die vornehmlich rechtsventrikuläre und endotheliale Lokalisation entspricht der physiologischen Wirkung des Enzyms.
9. TGF- $\beta_1$  positive Zellen finden sich nur selten im Myokard der Ratte und liegen interstitiell. Sie zeigen in ihrer Lokalisation keine Nachbarschaftsbeziehung zu fibrotischen Arealen. Auch eine Häufung mit zunehmendem Alter ist nicht erkennbar.
10. aFGF positive Zellen finden sich nur vereinzelt im Gewebeschnitt im Interstitium, aber auch hier findet sich kein Hinweis auf eine Kolokalisation von vermehrter Fibrose mit dem Auftreten von positiven Zellen.

Bezüglich der Wachstumsfaktoren ist also zusammenfassend zu sagen, daß sich hier sowohl bei jungen, wie auch in Herzgewebe seneszenten Tiere, das morphologisch durch deutlich vermehrte Fibrose auffällt, eine sehr seltene Exprimierung findet. Die beiden Rattenstämme unterscheiden sich also hauptsächlich bei den seneszenten Tieren in den morphometrisch erhobenen Parametern (Fibrose, Myozytenbreite, Kapillardichte), ohne daß sich dies hier in einem statistisch signifikanten Unterschieden niederschlägt.





## 4. Diskussion

### 4.1.1. Fibrose und Kollagen

Die Hauptbestandteile des fibrillären Interstitiums im Herzen sind die Kollagene vom Typ I und III, Proteine, die von Fibroblasten und fibroblastenähnlichen Zellen gebildet werden. In Kultur gehaltene Fibroblasten produzieren dabei etwa einen Anteil von 80% Kollagen I und 20% Kollagen III neben Kollagen V und Fibronectin<sup>10</sup>. Die Regulation der Kollagenproduktion erfolgt durch lokal wirksame Signalmetaboliten sowie solche Signalmoleküle, die durch den Blutstrom zum Interstitium des Herzens gelangen.

Kollagene, Fibronectin und andere Matrixproteine bilden die Bestandteile der Fibrose.

Eine erhöhte Fibrose trägt zur Zunahme der Steifheit des Myokards bei, vor allem was die diastolische Wandspannung betrifft. Eine gesteigerte Synthese von Kollagen bewirkt schließlich eine Abnahme der systolischen Wandspannung mit der Folge einer verminderten Verkürzungsfähigkeit und Abnahme der Auswurfleistung.

Untersuchungen von pathologischen Veränderungen des Myokards waren bisher hauptsächlich auf die Rolle des Herzparenchyms oder des Cardiomyozyten und seiner Funktionsfähigkeit konzentriert. Bisher wurde angenommen, daß die Rolle des Bindegewebes im Herzen sich auf den Zusammenhalt, die mechanische Verbindung der kontraktilen Elemente (des Parenchyms) beschränkt.

Umbauvorgänge im Bindegewebe wurden als langsame Reaktionen betrachtet, die eher im Sinne von Reparaturvorgängen zu betrachten sind wie z.B. bei einer Replacement-Fibrose nach dem Untergang von Herzmuskelzellen. Der Umsatz von Kollagen unterliegt jedoch einer eigenen dynamischen Regulation, wie weiter unten beschrieben.

### 4.1.2. Kollagen

Kollagene sind Proteine, die für die Festigkeit und Elastizität, sowie Zellverbindungen in der extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Sie werden von vielen Zellen einschließlich Fibroblasten synthetisiert und z.T. als Vorstufe in die interzelluläre Grundsubstanz, die vor allem aus Proteoglykanen besteht, sezerniert. Es existieren mindestens 16 verschiedene Arten von Kollagen, die in fibrilläre

(Kollagen I, II, III, V, XI) und nichtfibrilläre eingeteilt werden können, die teilweise auch netzartige Strukturen bilden, wie z.B. Kollagen IV, das Bestandteil der Basalmembran der Zellen ist. Sie besitzen alle eine Triplehelixstruktur und unterscheiden sich in ihren nichthelikalen Domänen, die Ihnen unterschiedliche Bindungseigenschaften und räumliche Struktur verleihen. Wir beschäftigten uns in dieser Arbeit nur mit den fibrillären Kollagenen I und III, die durch die Picrosiriusrotfärbung dargestellt wurden.

90% des Kollagens des gesamten Organismus bestehen aus Kollagen I. Es stellt vereinfacht ein stabförmiges Molekül dar, das eine Länge von 300 nm und einen Durchmesser von 1,5 nm hat. Grundstruktur ist dabei eine rechtsgewundene Triplehelix von zwei  $\alpha 1(I)$  Ketten und einer  $\alpha 2(I)$  Kette, wobei jede der einzelnen Ketten aus 1050 Aminosäuren besteht, so daß das Molekül einem verdrehten Seil nicht unähnlich ist. Bausteine sind dabei Glycin, Prolin und eine beliebige andere Aminosäure, die sich wiederholt aneinanderreihen.

Die Zugbelastbarkeit dieses Moleküls ist enorm, vor allem weil sich nach Exozytose aus der Zelle mehrere Moleküle Seite an Seite lagern und zu etwa 50nm dicken Fibrillen verbinden. Mehrere solcher Fibrillen bilden durch seitliches Aneinanderlagern wiederum eine Kollagenfaser.

Typ I und Typ III-Kollagen kommen häufig zusammen in Haut und Muskel vor. Typ III Kollagen unterscheidet sich dadurch von Typ I, daß es aus drei  $\alpha 1(III)$  Helices besteht, während Kollagen I aus zwei  $\alpha 1(I)$  und einer  $\alpha 2(I)$  Helix besteht. Die mechanische Verbindung des extrazellulär gelegenen Kollagens zu den Myozyten ist auf der Höhe der Z-Banden lokalisiert, wie Untersuchungen an isolierten Papillarmuskeln durch Rasterelektronenmikroskopie gezeigt haben <sup>11</sup>.

#### **4.1.3. Kollagen turnover**

Die Produktion des Kollagens kann durch verschiedene Signalstoffe in Gang gesetzt werden, z.B. Angiotensin II <sup>3</sup>, PDGF <sup>12</sup> oder TGF beta1 unter Hypoxie<sup>13,14</sup>. Angiotensin II stimuliert in Fibroblastenkulturen die Synthese der messenger RNA von Typ I Kollagen dosisabhängig <sup>15</sup>. Die Fibroblasten von SHR sind dabei stärker stimulierbar als die der normotensiven WKY Ratte <sup>16</sup>.

Der Abbau der verschiedenen Kollagene geschieht vor allem durch Metalloproteinasen, zu denen auch Kollagenase gehört, die ebenfalls von Fibroblasten produziert werden. Als Regulator des Kollagenabbaus wirkt vermutlich auch Angiotensin II, das die kollagenolytische Aktivität hemmt und die Synthese aktiviert <sup>17</sup>. Eine Hemmung durch ACE-Hemmer beeinflußt den fibrotischen

Prozeß günstig, wenn die Therapie vor Einsetzen einer Herzinsuffizienz einsetzt <sup>3,18</sup>. Daneben spielt Bradykinin, NO und Prostaglandin eine Rolle bei der Hemmung der Kollagensynthese und bei der Steigerung des Abbaus von Kollagen. Die letztgenannten Substanzen zeigten diese Wirkung besonders in Fibroblastenkulturen <sup>19,20</sup>.

Biochemische Analysen des Hydroxyprolinumsatzes lassen darauf schließen, daß ein großer Anteil des produzierten Kollagens bei seneszenten Tieren von 24 Monaten nicht nur im Extrazellulärraum deponiert wird, sondern unmittelbar wieder abgebaut wird <sup>21</sup>. Die mRNA-Werte bedeuten also nicht unbedingt, daß das Protein auch im Interstitium verbleibt.

Die Halbwertszeit des Kollagenproteins wird von Turner im rechten Ventrikel mit 80 bis 120 Tagen (2,6 bis 4 Monate) angegeben <sup>22</sup>.

#### **4.1.4. Einfluß von Alter, Hochdruck und körperlicher Belastung auf die Kollagen-akkumulation des Herzens**

Eghbali et al. ,der die Kollagenakkumulation im Rattenherzen in verschiedenen Altersstufen bei Fischerratten anhand des Anteiles an extrahierbarem Hydroxyprolin untersuchte, ermittelte eine Verdopplung der Proteinkonzentration im linken Ventrikel von Ratten eines Alters von 22 Monaten (5,5% auf 12%) im Vergleich zu einmonatigen Tieren <sup>23</sup>. Vergleichbare morphometrische Methoden wurden bei der Ratte zur Quantifizierung des Kollagens von Anversa und auch von Cornwell angewandt, die einen Anstieg des sogenannten Kollagengehaltes mit zunehmendem Alter fanden, als sie Ratten im Alter von 4-32 Monaten untersuchten <sup>24,25</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wiesen die Spontan Hypertensiven Ratten eine stärkere Fibrose auf als die gleichalten Wistar Ratten, vergleichbar mit den Ergebnissen von Hinglais. <sup>26</sup>. Obwohl sich ähnliche Veränderungen bei jungen an Bluthochdruck leidenden Ratten im Vergleich zu alten Ratten bezüglich der Herzhypertrophie zeigen, argumentiert Lakatta, daß die Hypertrophie dennoch nicht das "common link" sein kann für zelluläre Veränderungen, die bei Altern und Hypertension auftreten. Die gleichzeitig auftretenden rechtsventrikulären Veränderungen ohne Hypertrophie der Myozyten mit Änderung des Myosin-Isoenzymmusters und veränderter cytoplasmatischer Calcium-Pumprate, die ja nicht durch einen erhöhten Druck verursacht sein können, sind sein Hauptargument <sup>27</sup>.

Mattfeldt sah bei 12 Mo. alten Ratten keine Fibroseareale, wohl aber bei seneszenten Ratten, was mit unseren Ergebnissen gut übereinstimmt.

Abgesehen von einem höheren Anteil an Kollagen ergeben sich für den Fall der pathologischen Herzhypertrophie auch Unterschiede in der Zusammensetzung des produzierten Kollagens, was hier jedoch nicht untersucht wurde. Es findet zunächst eine stärkere Produktion von Kollagen III statt, das eine höhere Elastizität besitzt. Dies wird später durch Kollagen I ersetzt. Narbengewebe mit stärkerer Zugbelastbarkeit entsteht.<sup>28</sup> Der Prozeß dient zunächst der Verminderung der Wandspannung, kann sich in der Spätphase dann aber mit verminderter diastolischer Füllung negativ auswirken.

Auch mit einem anderen methodischen Vorgehen, dem Nachweis der m-RNA für Kollagen  $\alpha 1$  (III) zeigten sich niedrigere Expressionsraten bei Wistar Ratten im Alter von 10 Monaten im Vergleich zu SHR<sup>29</sup>. Analog zu dem Konzept des kritischen Herzgewichtes, das Linzbach bei einem Gewicht von 500g für den Menschen erreicht sah, entwickelte Knieriem ein Konzept der kritischen Bindegewebsmenge und postulierte, daß ab einem Bindegewebsanteil von 20% eine myokardiale Dekompensation eintritt, unabhängig davon, wie sie entstanden ist.

Diese kritische Grenze wurde hier noch nicht von den seneszenten Tieren erreicht.

#### **4.1.5. Kollagen und Alter**

Junge Kollagenmoleküle bestehen wie oben erwähnt aus einer Triplehelixstruktur. Die Bindungen dieser Helices werden durch Wasserstoffbrücken aufrechterhalten. Der Alterungsprozeß bringt eine vermehrte Quervernetzung der Moleküle mit sich, so daß sie schließlich als rigides Dimer oder Trimer vorliegen, dessen Elastizität verlorengegangen ist<sup>30</sup>.

#### **4.1.6. Training und Fibrose**

Für die Belastung durch Ausdauertraining ermittelte Jacob bei jungen 200g schweren Sprague Dawley Ratten nach Schwimmtraining von mindestens 8 Wochen für 90 Minuten pro Tag keinen Anstieg des Hydroxyprolingehaltes gegenüber den Kontrolltieren, bezogen auf das Herztrockengewicht.<sup>31</sup> Tomanek et al 1972<sup>32</sup> und auch Kiiskinen und Heikkinen 1976<sup>33</sup> stellten keine Veränderungen in der extrazellulären Matrix bei jungen Tieren fest (männl. Albinoratten bzw. Mäuse). Sie fanden keinen Unterschied in der Konzentration von Kollagen- und Nichtkollagenproteinen nach Training.

Mit zunehmendem Alter ermittelte Tomanek zwar eine höhere Kollagenkonzentration im Herzgewebe. Die Werte waren aber für trainierte und untrainierte Tiere gleich groß.

Craig et al. verzeichneten dagegen einen Anstieg des Hydroxyprolingehaltes um 28,5% bei weiblichen Wistar Ratten von 175g Ausgangsgewicht, die für die Dauer von 10 Wochen einem Schwimmtraining von 6h pro Tag an 5 Tagen pro Woche unterzogen worden waren<sup>34</sup>.

#### 4.1.7. Vimentin

Vimentin gehört zu den Intermediärfilamenten (ca. 7-10 nm dick), die eine Hauptkomponente des Zytoskeletts darstellen. Als filamentäres Protein hilft es neben anderen Proteinen die mechanische Stabilität der Zellstruktur von mesenchymalen Zellen (Fibroblasten, Chondrozyten und Endothelzellen) zu erhalten, indem es wie ein Stützgerüst an der Plasmamembran anhaftet. Zu den Intermediärfilamenten gehören auch Keratin (Haut), Desmin (Muskelsarkomer, glatte Muskelzelle), GFAP glial fibrillary acidic protein (Astrozyten), NF Neurofilamentproteine (Neurone) und Lamin (kernhaltige Zellen). Die Gemeinsamkeit der Intermediärfilamente besteht in einer zentralen alpha-helikalen Struktur, während die beiden nicht helikalen Enden (Kopf und Schwanz) hypervariabel sind<sup>35</sup>. Man kann sich die beiden alpha Helices als umeinander gewundene Stäbe vorstellen, die ein Dimer bilden (sogenannte coiled coil Struktur), wobei die C terminalen Enden aneinandergelagert sind. Zwei Dimere bilden dann wieder ein Tetramer, zwei Tetramere ein Oktamer, so daß dichtgepackte Polypeptidketten entstehen, die wiederum durch andere Proteine quervernetzt werden.

Während der Übergangsphase zum Herzversagen fanden einige eine erhöhte Genexpression von Vimentin neben alpha I Kollagen<sup>36</sup>.)

#### 4.1.7. Vergleichswerte Kollagengehalt

Tab. 4: Ein tabellarischer Überblick über eigene und die Ergebnisse andere Untersucher.

Autor	Methode	Stamm	Alter	"Gehalt" an Koll in % LV
Anversa, Circ Res 67, 1990		Fischer 344	1-4 Mo	5,50%
Jalil et al 89	Sirius Red	WKY	300g	3%

Anversa,Circ Res 67,1990		Fischer 344	22-26Mo	12-16%
Michel,Salzmann 86	Videodensit.	Wistar	1 Mo	0,74%
Michel,Salzmann 86	Videodensit Sirius Red.	Wistar	3Mo	1,67%
Michel,Salzmann 86	Videodensit.	Wistar	6Mo	5,42%
Silver, MA, Cardiovasc.Res.1990	Sirius Red	Wistar	250-300g	2-4%
eigene Ergebnisse	Sirius Red	WKY	9Wo	8,2%
eigene Ergebnisse	Sirius Red	WKY	22Mo	14,7%
eigene Ergebnisse	Sirius Red	SHR	9Wo	11,48%
eigene Ergebnisse	Sirius Red	SHR	22Mo	17.93%

Die obengezeigte Tabelle beinhaltet unterschiedliche Methoden und Tierstämme mit denen der Kollagengehalt des Rattenherzens bestimmt wurde und zeigt Werte, die bei Fischer 344 Inzuchtratten ermittelt wurden. Man sieht jedoch, daß sich je nach Alter und Methode die Größenordnung zwischen einem Minimum von 0,74% bis zu einem Maximum von 29% bewegen kann.

### **Schlußfolgerung**

Für die Altersgruppe der seneszenten Tiere über 20 Monate besteht Übereinstimmung mit den oben zitierten Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die gleichfalls eine Zunahme des Kollagengehaltes feststellten. Die allgemeine Schlußfolgerung aus den Resultaten der vorliegenden Arbeit ist also, daß der Kollagengehalt des Myokards durch den Alterungsprozeß deutlich erhöht wird und daß eine chronische Erhöhung des Blutdrucks mit begleitender kardialer Hypertrophie diesen Prozeß nicht weiter verstärkt.

#### **4.2.1. Herzhypertrophie und Myozytenbreite**

##### **Hypertrophie, Tiermodell**

Wie sich in der Framingham-Studie gezeigt hat, sind arterielle Hypertonie und die koronare Herzkrankheit beim Menschen die Hauptursachen für eine Herzinsuffizienz. Eine Drucküberlastung des Herzens führt neben der Hypertrophie der einzelnen Herzmuskelzellen auch zu einer Aktivierung von Fibroblasten, die zur verstärkten Synthese von Kollagen I und III angeregt werden. Dieser Vorgang, der als Remodelling bezeichnet wird, ist eine der Ursachen für eine vermehrte Steifigkeit und verminderte diastolische Füllung des linken Ventrikels. Diese Vorgänge führen letztlich über eine vermehrte Fibrose zu einer Herzinsuffizienz. Es gibt viele Hinweise dafür, daß das Renin-Angiotensin-

Aldosteron System in die strukturelle Umorganisation der extrazellulären Matrix eingreift <sup>37</sup> .

Bei etwa 60% der männlichen SHR tritt der Zustand der Herzinsuffizienz zwischen dem 18 und 24 Lebensmonat ein <sup>18</sup> .

Nach Meerson kann man die Phasen der myokardialen Hypertrophie wie folgt einteilen: 1). Stadium der Adaptation. Die veränderte Belastung bewirkt eine verstärkte Proteinbiosynthese. 2). Stadium der stabilen Hyperfunktion (kompensierte Hypertrophie). Es stellt sich eine Normalisierung der Zellstruktur bei vergrößerten Herzmuskelzellen ein, die Proteinsynthese fällt wieder auf Normwerte ab. 3). Stadium der graduellen Erschöpfung Die Zellstruktur verändert sich erneut nun jedoch degenerativ, die Proteinsynthese fällt ab. Eine interstitielle Fibrose ist nachweisbar <sup>38</sup>.

Die Differenzierung dieser verschiedenen Phasen im Gewebe ist allerdings schwierig, da sich eine qualitativ ähnlich erscheinende Morphologie der einzelnen Myozyten ergeben kann und es schwer sein kann zwischen einem Anpassungsvorgang und einem pathologischen Prozeß zu unterscheiden. Unmittelbar als Antwort auf eine vermehrte Belastung kommt es zu einer vermehrten Proteinsynthese als Ausdruck des Wachstumsprozesses der Kardiomyozyten <sup>2,39</sup>. Lichtmikroskopisch ist dies durch eine Zunahme der Wanddicke des linken Ventrikels und eine deutliche Zunahme der Myozytengröße gekennzeichnet <sup>40</sup>.

Die Phase der graduellen Erschöpfung macht sich lichtmikroskopisch durch vermehrte interstitielle Fibrose bemerkbar. Elektronenmikroskopische Untersuchungen können dann bei ca. 20 Monate alten SHR an Myozyten einen deutlichen Verlust an kontraktilen Material feststellen. In der Regel finden sich diese Myozyten in der Nähe von fibrotischen Arealen. Manchmal sind sie von anderen Myozyten völlig durch Bindegewebe separiert. Ähnlich den Veränderungen, die in humanem Gewebe beschrieben wurden, stellten Holubarsch und Thiedemann et al. bei 10 Monate alten Ratten nur geringe perivaskuläre Fibrose fest, fanden bei 20 Monate alten Tieren der SHR dann jedoch eine deutliche Varianz in der Größe der Myozyten, diffuse interstitielle Fibrose und ultrastrukturell einen Verlust an kontraktilen Material<sup>41,42</sup>. Dies entspricht im Wesentlichen den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen.



#### **4.2.2. Herzhypertrophie und Alter**

Als alte bzw. seneszente Tiere werden bei Ratten solche ab etwa einem Alter von zwei Jahren bezeichnet, da die spontane Mortalität etwa in diesem Alter bei manchen Stämmen mit normaler Fütterung fünfzig Prozent erreicht <sup>43</sup>. Wistar Ratten erreichen erst mit einem Alter von etwa 36 Monaten die 50% Mortalität. Der Effekt der selektiven Mortalität wird hiermit angesprochen, wie er in Querschnittstudien mit verschiedenen Altersklassen auch schon zu Beginn des Lebens im Postnatalstadium auftreten kann. Möchte man diese Effekte auszuschließen ist man auf nichtinvasive Längsschnittuntersuchungen angewiesen.

Für die Wand des linken Ventrikels ist sowohl bei normotensiven untrainierten, stärker jedoch bei hypertensiven Individuen mit zunehmendem Alter eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zu erkennen. Dies gilt sowohl für den Menschen wie auch für das Tiermodell. Die Abnahme der Compliance in den Gefäßen führt zu einem insgesamt höheren peripheren Widerstand, der zu einer Erhöhung des Blutdrucks und zu einer Hypertrophie der einzelnen Herzmuskelzellen beiträgt. Makroskopisch ist der Durchmesser der freien linken Ventrikelwand erhöht. Dies ist auf die hier untersuchten Tierstämme uneingeschränkt übertragbar. Herzen von alten WKY-Ratten sind makroskopisch aber auch mikroskopisch nicht von denen der SHR zu unterscheiden.

Neben dem Herzen der Wistar Ratte wurde von anderen Gruppen das Rattenherz bei Fischer - und Sprague Dawley -Ratten als Modell des alternden Herzens untersucht, wenn sich auch wie oben erwähnt nicht immer die typischen Altersveränderungen des menschlichen Herzens ergaben. Zusammengefaßt kann man sagen, daß auch normotensive Rattenstämme eine Abnahme der Myozytendichte und eine Zunahme in der Faserdicke zeigten<sup>44</sup>, wie es mit einem harmonischen Herzwachstum vereinbar ist. Bei hypertensiven Stämmen wird jedoch das Stadium der graduellen Erschöpfung früher erreicht und geht mit einem erhöhten Grad an Herzhypertrophie und Fibrose einher.

#### **4.2.3. Physiologische Herzhypertrophie/Pathologische Herzhypertrophie**

In den Auswirkungen ist die adaptive harmonische Hypertrophie, die durch Training erreicht wird, nicht mit der durch langanhaltende Druck- oder Volumenüberlastung zu vergleichen. Biochemisch werden unterschiedliche Myosinketten verstärkt synthetisiert (alpha bei Schwimmtraining,  $\beta$ -Myosin bei pathologischer Hypertrophie). Veränderungen in der Gefäß- und Myozytenarchitektur und der Sauerstoffversorgung des einzelnen Kardiomyozyten

führen dagegen bei langdauerndem Hochdruck des Herzens schließlich zu disproportioniertem Wachstum der Myozyten, disproportionierter Bildung von Fibrose und strukturellem Remodelling. Folge ist eine erhöhte Steifigkeit der extrazellulären Matrix mit verminderter diastolischer Füllung. Abgesehen vom morphologisch nachvollziehbaren Wandel muß aber auch die teils erhebliche pathophysiologische Veränderung bedacht werden, die mit verlängerter Kontraktions- und Relaxationszeit der Myozyten verbunden sein kann <sup>45</sup>

Vergleichswerte in der Literatur geben für die hier betrachtete Myozytenbreite eine mittlere Größe von  $19,5\ \mu\text{m}$  bei 5 Monate alten Fischer Ratten an mit einer Schwankungsbreite zwischen  $8,3$  bis  $45,2\ \mu\text{m}$  <sup>46</sup>. Für etwa 9 Wochen alte Tiere fanden Bishop et al.  $15,7\ \mu\text{m}$  als Mittelwert mit einer Schwankungsbreite zwischen  $7,0$  bis  $34,6\ \mu\text{m}$ . Brooksby et al. stellten schon bei zwei und drei Monate alten WKY und SHR signifikante Unterschiede in der Breite fest als sie isolierte Myozyten untersuchten <sup>47</sup>. Wir fanden als höchste Mittelwerte für WKY  $18,9\ \mu\text{m}$  und für SHR  $24,6\ \mu\text{m}$  bei 22 Monate alten Tieren, wobei auch hier wie bei anderen eine größere Varianz im Alter gefunden wurde.

#### 4.2.4 Vinculin

Vinculin ist ein Protein des Zytosols von Herzmuskelzellen, das an der Verbindung von Aktinfilamenten mit der Plasmamembran mitwirkt. Sein Molekulargewicht beträgt 116 kilo Dalton. Es findet sich in den Disci intercalares, wo es durch Bindung an  $\alpha$ -Actinin, ein Protein welches wiederum selbst an Aktinmoleküle bindet, hilft die Kraftkopplung der intrazellulär wirksamen Aktin-Myosin-Komplexe mit einem Membranprotein herzustellen. Vergleicht man die einzelne Herzmuskelzelle vereinfachend mit einem zylindrischen Gefäß, so findet sich das Protein vor allem im Boden und Deckel. Der hier verwendete Antikörper diente so zur Markierung der Glanzstreifen.

#### 4.2.4. Vergleichswerte

Tab. 5: Eine Zusammenstellung von Ergebnissen anderer Untersucher und eigener Werte.

Autor	Myobreite in $\mu\text{m}$	Myobreite li.V.	Stamm	Alter
Bishop, Drummond	15,7		Fischer	9 Wochen
Bishop, Drummond	19,5		Fischer	9 Wochen
Hort, Horvath 1976	15-17,5		Ratte	k. Angabe

Angelakos et al 64		11,8	Ratte	k. Angabe
Rakusan 1984		17,7	WKY	20 Wo
Rakusan 1984		18,6	SHR	20 Wo
Rakusan 1984		18,7	WKY	15 Mo
Rakusan 1984		20,6	SHR	15 Mo
Rakusan 1984		18,2	WKY	23 Mo
Hinglais 97		17,05	SHR	4 Mo
Hinglais 97		18,15	SHR	7,5 Mo
Rakusan 1984		21,6	SHR	23 Mo
eigene Werte		15,5	WKY	5 Mo
eigene Werte		16,5	SHR	5 Mo
eigene Werte		14,6	WKY	15 Mo
eigene Werte		17,7	SHR	15 Mo
eigene Werte		18,9	WKY	22 Monate
eigene Werte		24,6	SHR	22 Monate

#### 4.2.5. Myozytenbreite und körperliche Belastung

Generell ergab sich in den meisten Untersuchungen nach körperlicher Belastung eine Zunahme in der Myozytenbreite oder in der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten. Als Beispiel sei die Untersuchung von Mattfeldt et al. angeführt <sup>48</sup> oder <sup>49</sup>. Andere fanden nach chronischer Belastung keinen erhöhten Durchmesser der einzelnen Myozyten <sup>50</sup> oder jedoch eine leichte Längenzunahme von ca. 5% bei etwa gleichbleibender Myozytenweite (hier 27,9  $\mu\text{m}$  bei Sprague Dawley nach 7 Monaten Lauftraining) <sup>51</sup>

#### 4.2.6. Myozytenbreite und Alter

Nach einer Phase des Wachstums mit Zunahme der Myozytenbreite stellte sich in den meisten Untersuchungen eine Phase stabiler Hypertrophie bei adulten Tieren ein. Im höheren Alter zeigten die Myozyten eine stärkere Varianz in der Dicke. Einige Autoren fanden Hinweise für eine verstärkte Aufzweigung der Kardiomyozyten. In den hier betrachteten Gewebeschnitten wurden solche als pathologisch zu wertenden Aufzweigungen nicht beobachtet.

### Schlußfolgerung

Erst in einem relativ hohen Alter von 22 Monaten läßt sich ein wesentlicher Unterschied in der durchschnittlichen Myozytenbreite aufzeigen. Der Stamm der WKY ließ in den verschiedenen Altersgruppen junger und adulter Tiere keine eindeutige Tendenz zur Verbreiterung der Myozyten erkennen. Dagegen zeichnete sich bei der SHR Gruppe eine tendenzielle Steigerung der Myozytendurchmesser mit zunehmendem Alter ab.

Hinsichtlich der Auswirkungen von körperlichem Training auf die Myozytenbreite kann festgehalten werden, daß adulte Ratten mit einem zu erwartenden Anstieg der Myozytenbreite auch auf kurzdauernde Belastung reagieren. Eine pathologische Hypertrophie entsteht hier nicht, sie liegt bei den seneszenten Tieren vor.

#### **4.3.1. Kapillardichte**

Ein Wachstum von Kapillaren findet sich beim adulten Organismus in der Regel nur in speziellen Gewebsarten, wie dem Endometrium oder Ovar, da Endothelzellen eine niedrige Mitoserate besitzen<sup>52</sup>. Aber auch Herz, Skelettmuskel und Gehirn können unter pathologischen Bedingungen in Phasen der Hypoxie zum Wachstum von Kapillaren stimuliert werden. Als quantitative Angabe zu dieser Frage findet man meist die Zahl der Kapillaren pro Fläche (Kapillardichte) oder das Verhältnis der Kapillarzahl zur Zahl der Kardiomyozyten als Kapillar/Faserrelation. Manche der quantitativen Angaben in der Literatur sind aus Präparaten gewonnen, die durch Tuscheinjektion hergestellt wurden. Dies beinhaltet jedoch mögliche Fehlerquellen, da sich die Tusche je nach Perfusionsdruck unterschiedlich verteilt und mit Plasmaproteinen Aggregate bilden kann, die zu einer Verstopfung von Kapillaren führen kann. Die bisherige histochemische Darstellung wurde meist durch die Reaktion der Alkalische Phosphatase, ATPase oder die PAS (periodic-acid-Schiff Reaktion) erreicht. Die Darstellung kann jedoch nach unserer Ansicht durch Markierung der endothelialen constitutiven Stickoxidsynthase (Ec-NOS) ebenso zuverlässig erfolgen.

Es ist zu bedenken, daß Verschiebungen in der Größenordnung des untersuchten Gewebes auf, da die Größe der Kardiomyozyten mit zunehmendem Alter zunimmt. Daher sollte in Phasen der Hypertrophie eine Abnahme der Kapillardichte zu verzeichnen sein, die aber nicht als Rarefizierung gedeutet werden darf, da sich ja das Referenzvolumen verändert hat. Findet sich jedoch eine Zunahme der Kapillardichte, so wäre dies ein Indikator für Kapillarrowachstum.

Für die ermittelten Werte der Kapillardichte ergibt sich im Literaturvergleich eine relativ große Variabilität der Werte, die bedingt sind durch unterschiedliche Tierstämme, Altersgruppen und Geweberegionen. Für tiefgefrorenes Gewebe gilt, daß die Schrumpffartefakte minimal sind.

#### **4.3.2. Wachstum und Kapillardichte**

Für die normalen Veränderungen während des Wachstums der Wistar-Kyoto Ratte ist von einigen Autoren eine Abnahme oder auch eine unveränderte Kapillardichte mit zunehmendem linksventrikulären Gewicht beschrieben worden <sup>48,53,54</sup>. Die Kapillar-Faser-Relation zeigt eine Zunahme in der Phase des Wachstums, was in der Tendenz mit unseren Werten übereinstimmt <sup>55-57</sup>.

Von einem Unterschied zwischen wilden Ratten und Laborratten berichteten Wachtlova und Rakusan, die eine größere körperliche Aktivität der Wildtiere mit einer höheren Kapillardichte in Zusammenhang brachten <sup>58</sup>.

Zusammengefaßt kann also für das normale Wachstum des Rattenherzens festgehalten werden, daß sich durch das Längen- und Breitenwachstum der Myozyten die Diffusionsstrecke vergrößert, gleichzeitig jedoch auch eine Proliferation der Kapillaren einsetzt, wie der Anstieg der Kapillar-Faser-Relation anzeigt.

Für pathologische Zustände des Herzens, wie die essentielle arterielle Hypertonie der SHR oder die Hypertonie infolge Aortenstenose wurde von einer Kapillarbetrrefikation berichtet. <sup>4,59</sup> Dies lies sich anhand unserer Ergebnisse nicht bestätigen.

In den meisten Studien zur pathologischen Herzhypertrophie findet sich diese Beziehung bestätigt. Die Zahlen von Turek ergaben für den rechten Ventrikel nach Ligatur der linken Koronararterie 1639 Kapillaren /mm<sup>2</sup> und für die Kontrollgruppe 2424 / mm<sup>2</sup> <sup>60</sup>. Zeichen eines Kapillarwachstums fanden sich hier nicht. Mattfeldt und Mall untersuchten die hier benutzte Kontrollgruppe der Wistarratten in Altersklassen von 5 Wochen bis 13 Monaten stereologisch. Als Hauptresultat fanden sie eine Zunahme der Kapillar-Faser-Relation um 48% obwohl die Dichte der Kapillarisierung bezogen auf mm<sup>3</sup> abgenommen hatte <sup>61</sup>. Auch andere Autoren berichten von einer meist signifikanten geringeren myokardialen Kapillardichte der SHR, wenn man sie mit altersgleichen Kontrolltieren wie WKY vergleicht <sup>53,55,62</sup>.

Zusammengefaßt zeigen hypertrophe Herzen eine niedrigere Dichte an Kapillaren als normale Herzen. Das mangelnde Wachstum führt auf Dauer zu einer Ausschöpfung der sogenannten Kapillarreserve, so daß die Versorgung bei Ruhe

gerade noch aufrechterhalten werden kann. Belastung führt allerdings zu einer Unterversorgung des Funktionsgewebes und auf lange Sicht zu deletären Folgen mit Herzversagen.

#### **4.3.3. Veränderungen der Kapillardichte beim trainierten Tier (Laufen/Schwimmen)**

Untersuchungen an Ratten verschiedener Altersgruppen nach Lauf- oder Schwimmtraining mit anderen Methoden, wie z.B. der H3 Thymidin - Aufnahme<sup>63,64</sup> von kapillären Endothelzellen zeigten einen Anstieg in der H3-Thymidin-Aufnahme und einen Anstieg der Kapillar/Faserrelation<sup>56,65-68</sup>. Die Hypertrophie wurde in diesen Studien durch eine Zunahme der Kapillardichte wettgemacht<sup>57,65,66,68</sup>.

Bei adulten Ratten wurde ebenfalls eine Zunahme der Kapillarisierung gesehen, die jedoch die Hypertrophie nicht ganz wettmachte.<sup>63,65,68,69</sup>. Ein Anstieg der Kapillar/Faserrelation wurde teils mit einem Verlust an Kardiomyozyten erklärt.

Je nach angewandtem Belastungsmodell wurde für Ratten eine Zunahme der Kapillardichte oder Kapillar-Faser-Relation des Herzens<sup>70,71</sup> ermittelt.

Mattfeldt<sup>48</sup> berichtet für die Belastung durch Laufen für den Zeitraum von 18 Wochen bei weiblichen Sprague-Dawley Ratten dagegen von einer gleichbleibenden Kapillardichte der Papillarmuskeln ähnlich wie Thomas nach 8 Wochen Lauftraining<sup>50</sup>. Mattfeldt fand jedoch eine erhöhte Längendichte der Kapillaren als Hinweis auf eine verbesserte Sauerstoffversorgung des Myokards und eine physiologische Hypertrophie.

Andere ermittelten jedoch auch eine Abnahme der Kapillardichte<sup>72</sup> oder Oberflächendichte von Kapillaren<sup>49,54,73</sup>.

Allerdings kamen Arbeitsgruppen mit anderen Tiermodellen und anderem Belastungsprogramm z.B. während Konstriktion der Aorta oder Induktion eines renalen Hypertonus nach Schwimmtraining von Ratten nicht zum gleichen Ergebnis und berichteten von einem Kapillarwachstum,<sup>74,75</sup>. Zusätzlich fanden sich auch Abweichungen in einzelnen Regionen des Herzens, wobei sich die Autoren in der Tendenz einig waren, daß subendokardial eine geringere Dichte vorliegt als epikardial.

Komplizierend kommt aber bei den Untersuchungen hinzu, daß einige Autoren Daten nur für den linken Ventrikel angaben, während andere die Werte für linken und rechten Ventrikel zusammen berechneten. Anversa fand bei leichter Belastung

durch Lauftraining eine Zunahme der Kapillardichte im rechten, nicht aber im linken Ventrikel. Ein verstärktes Belastungsprogramm ergab keine Zunahme der Dichte im linken Ventrikel und zusätzlich eine Abnahme im rechten Ventrikel. Daher sollte eine isolierte Angabe für den jeweiligen Ventrikel gemacht werden.

Einige Studien weisen darauf hin, daß ein nur mildes Trainingsprogramm zu einer Kapillarproliferation beitragen kann, während anstrengendes Training hierzu keinen Stimulus bietet, bzw. die Kardiomyozytenhypertrophie dominiert. Möglicherweise können alte Tiere nicht mehr mit der gleichen Gefäßneubildung reagieren, wie sie bei jungen Tieren gesehen wird.

Die von Jacobs und Bell untersuchten jungen männlichen Ratten zeigten die deutlichste Steigerung, während bei älteren Tieren das Kapillarwachstum mit dem Hypertrophiegrad der Kardiomyozyten Schritt hielt. <sup>66,68</sup>

Regelmäßiges Training scheint die mittlere Überlebensdauer von männlichen und weiblichen Ratten zu erhöhen, ohne ihre maximale Lebensdauer zu verlängern <sup>76</sup>. Hinsichtlich der Gefäßversorgung führt Training nach Meinung mancher Autoren zu einem Wachstum von größeren Koronargefäßen, weniger von Kapillaren. Eine Ausnahme bilden junge Tiere, wie Hudlicka und Brown bemerken <sup>77</sup>.

#### 4.3.4. Vergleichswerte

Folgende Vergleichswerte fanden sich in der Literatur und wurden hier als Übersicht zusammengestellt: <sup>78</sup>

Tab. 6: Kapillaranschnitte pro Flächeneinheit im Querschnitt = Oberflächendichte

Autoren	Herz ohne Diff./Ppm.	linker Ventrikel	K/Myo	Stamm	Alter
Wachtlov.1967,PhysBohem	3803 K/mm <sup>2</sup>		k.A.	Rat. norv	
Poupa Rakusan, 1970.	3600 K/mm <sup>2</sup>		0,67		4Wo.
Poupa Rakusan, 1970.	2700 K/mm <sup>2</sup>		1.00		adult
Henquell et al 1976	2100 K/mm <sup>2</sup>				adult
Korecky 1982	3178K/mm <sup>2</sup>				
Mattfeldt T. 1990	Papillarmuskel 4856 K/mm <sup>2</sup>			WKY wbl	5Wo
Mattfeldt T. 1990	Papillarmuskel 3067 K/mm <sup>2</sup>			WKY wbl	13 Mo
Mattfeldt T. 1990	Papillarmuskel 3155 K/mm <sup>2</sup>			WKY mnl	28 Mo
Mall et al. 1990	Papillarmuskel		1,34	Wist mnl	13Wo
Mall et al. 1990	Papillarmuskel		1,48	Wist mnl	13 Mo

Wachtlov.1967,Physiol.		2908 K/mm <sup>2</sup>	k.A.	”	
Gautier,Martini1964		2180 K/mm <sup>2</sup>	k.A.	Laborratt	
Tomanek,Hovanec 81		5069Kmm <sup>2 ep</sup>		Wistar	4 Wo
Tomanek,Hovanec 81		4914K/mm <sup>2 ep</sup>		SHR	4 Wo
Tomanek,Hovanec 81		3900 K/mm <sup>2 ep</sup>		Wistar	22Mo
Tomanek,Hovanec 81		3400 K/mm <sup>2 ep</sup>		SHR	22Mo
Frenzel, Schwartzk. 1988		2386 K/mm <sup>2</sup>	0,91	Wist wbl	200g
Frenzel, Schwartzk. 1988	nach Training	1863 K/mm <sup>2</sup>	0,94	Wist wbl	200g
eigene Werte		2571 K/mm <sup>2</sup>	1,03	SHR mnl	9Wo
eigene Werte		2583 K/mm <sup>2</sup>	1,06	WKY mnl	9Wo
eigene Werte		1048 K/mm <sup>2</sup>	1,2	SHR mnl	22Mo
eigene Werte		1316 K/mm <sup>2</sup>	1,12	WKY mnl	22Mo

Pathophysiologisch geht man bei der Entstehung von Kapillaren von einem vermehrten Wandstress der Gefäßwände von Endothelzellen mit konsekutiver Ausschüttung von lokalen Zytokinen aus und nimmt zusätzlich für das Entstehen von neuen Kapillaren eine Ruptur der Basalmembran an, die wiederum zur Aktivierung von Metalloproteinasen und Plasminogen-Aktivator mit nachfolgender Migration und Proliferation von Endothelzellen führt.

#### 4.3.5. EC-NOS

Die hier zur Darstellung der Kapillaren verwendete Stickoxidsynthase (NOS) ist ein zelltypspezifisches Enzym, das die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert. Stickstoffmonoxid ist ein kurzlebiges Radikal, welches als zelluläres Signal die Relaxation von Gefäßen bewirken kann, aber auch eine Zytotoxizität. 1987 wurde Stickstoffmonoxid als "endothelium derived relaxing factor" identifiziert <sup>79</sup>. Es gilt als allgemein akzeptiert, daß dieses zunächst als luftverschmutzendes anorganisches Gas in Abgasen und Zigarettenrauch gefundene Molekül, eine große Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus und des Blutdruckes spielt.

Die ursprüngliche Klassifikation der Isoenzyme von Stickoxidase beruhte auf biochemischen Eigenschaften der gereinigten Enzyme in NOS I bis III <sup>80</sup>. Andere teilten sie nach dem Organ in dem sie zuerst entdeckt wurden ein <sup>81</sup>. In Neuronen und Endothelzellen werden membranständige constitutive Stickoxidsynthasen (cNOS) von Agonisten aktiviert, die die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen. Zu den cNOS gehört ECNOS = Endotheliale NOS (ECNOS)= Typ III und



bNOS = brain NOS = nNOS (neuronale NOS)= Typ I während die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase iNOS oder mac-NOS(Macrophage)= Typ II bei entzündlichen Prozessen eine besondere Rolle zu spielen scheint und. Sie arbeitet Calcium und Calmodulin unabhängig.

Die endotheliale NOS wird in ihrer Aktivität durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gesteuert. Als Agonisten wirken rezeptorvermittelt Acetylcholin, Adeninnukleotide, Serotonin, Bradykinin oder rezeptorunabhängig mechanische Stimuli wie der sogenannte shear stress <sup>82</sup> und erhöhen den intrazellulären Calciumspiegel. Shear stress stimulierte Bildung von NO ist assoziiert mit einer stärkeren Expression der endothelialen NO-Synthase und könnte so zu günstigen Effekten von körperlichem Training auf das cardiovaskuläre System führen <sup>83</sup>. Der physiologische Effekt ist so eine unmittelbare Verstärkung des lokalen Blutflusses mit Verbesserung der Sauerstoffversorgung von Geweben unter Beanspruchung <sup>84</sup>. Das Molekulargewicht der humanen endothelialen NO-Synthase beträgt etwa 133 kDa <sup>85</sup>. Sie ist im nativen Zustand ein als Homodimer vorliegendes Enzym.

Die Untersuchung der mRNA von 5 Wochen und 13 Wochen alten SHR und WKY Ratten ergab für die NOS III oder endotheliale NOS keine wesentliche Differenz bezüglich der Exprimierung dieser mRNA bei beiden Stämmen im jeweiligen Alter, so daß eine Herunterregulierung der mRNA nicht für die veränderten hämodynamischen Parameter der hypertensiven Ratten verantwortlich sein wird <sup>86</sup>. Dennoch scheint die Freisetzung des endothelialen NO als Reaktion auf verschiedene Stimuli vermindert zu sein. Dies wird als Dysfunktion des Endothels gedeutet, die eine Konsequenz des dauerhaft erhöhten Blutdruckes ist. Denn die therapeutische Anwendung von einer Reihe von Medikamenten kann die Antwort des Endothels auf relaxierende Substanzen wie Acetylcholin normalisieren.

Produktionsort der NOS III sind neben den Endothelzellen auch Kardiomyozyten, wie in situ Hybridisierungsversuche ergaben <sup>87,88</sup>.

Das Substrat der endothelialen NOS ist die Aminosäure L-Arginin, die zu L-Zitrullin und NO reduziert wird. Die Reaktion ist stereospezifisch, D-Arginin ist kein Substrat. Für die Reaktion werden Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) und Glutathion, als Cofaktoren Häm, FMN, FAD und als Co-Substrat  $\text{O}_2$  und NADPH benötigt <sup>85</sup>.

Bei SHR wurde in den Blutgefäßen eine erhöhte calciumabhängige NOS Aktivität beobachtet <sup>89-91</sup>. Trotz dieser erhöhten Konzentration an calciumabhängiger NOS-Aktivität ist die endothelium-abhängige Relaxation der Gefäße vermindert, weil kontrahierende Faktoren überwiegen, die Cyclooxygenase abhängig sind. <sup>92,93</sup>. Indomethacin normalisiert nämlich die Funktion des Endothels bei hypertensiven

Patienten, wenn sie einer intraarteriellen Infusion von Acetylcholin ausgesetzt werden <sup>94</sup>.

Die Darstellung von EC-NOS mit der hier benutzten Immunfluoreszenzmethode erlaubte keine Aussage hinsichtlich der Aktivität des Enzyms im Gewebe. Anhand der Immunfluoreszenzbilder ergaben sich keine Hinweise darauf, daß SHR und WKY in der Sättigung des Fluorochroms unterschiedlich sind.

Knockout Mausmutanten, denen die endotheliale NOS fehlte, entwickelten einen Hypertonus <sup>95,96</sup>. Es wurden jedoch keine histopathologischen hypertensiven Veränderungen an den Herzen dieser Tiere gesehen, wie sie etwa bei SHR auftreten.

### **Schlußfolgerung**

Anhand der hier gefundenen Ergebnisse läßt sich sagen, daß einhergehend mit einer Zunahme der Myozytenbreite mit zunehmendem Alter der Versuchstiere ein Abnahme der Kapillarzah pro Flächeneinheit einhergeht. Die Kapillar-Faserrelation hat sich jedoch nicht verschlechtert. Dennoch muß eine Kapillare nun einen weit größeren Bezirk versorgen, vergleicht man eine 22 monatige Ratte mit einem 9 Wochen alten Tier. Im seneszenten Myokard entsteht somit eine grenzwertig kompensierte Versorgungssituation, die durch den bei SHR bestehenden Hypertonus noch akzentuiert wird.

#### **4.4.1. Myozytendichte**

Es ist erstaunlich, daß sich bei einem Wert wie der Myozytendichte auch in der Literatur eine relativ große Variabilität der Angaben finden läßt. Man muß jedoch bedenken, daß sich Einflußfaktoren wie Stamm, Gewinnung und Fixierung des Gewebes, Vergrößerung, Ausrichtung des Gewebeschnittes, und andere auf diese Zählungen auswirken.

#### **4.4.2. Vergleichswerte**

Tab. 7: Folgende Vergleichswerte fanden sich für die Myozytendichte in der Literatur

<b>Autor</b>	<b>Myo/mm<sup>2</sup></b>	<b>Myo/mm<sup>2</sup> LV</b>	<b>Stamm</b>	<b>Alter</b>
Anversa et al 78	5470-6520			
Anversa et al 79	4710			
Rakusan et al 80	3105-3284			

Rakusan, Poupa 64	2465			4 Mo
Rakusan, Poupa 64	2504			26 Mo
Wachtlova et al 65	2666		Laborratte	
eigene Werte		2496	SHR	9 Wo
eigene Werte		2441	WKY	9 Wo
eigene Werte		873	SHR	22 Mo
eigene Werte		1170	WKY	22 Mo

### Schlußfolgerung

Die gesehene Abnahme der Myozytendichte im seneszenten Alter geht Hand in Hand mit einer Größenzunahme der mittleren Myozytenbreite als Ausdruck der Hypertrophie des Herzens. Warum sich die Myozytendichte nach Training nicht bei allen Tiergruppen in der erwarteten Weise verändert und immer eine klare Abnahme zeigt, kann nur analog zur Myozytenbreite diskutiert werden. Entweder ist die Reaktionsweise junger Tiere anders, oder aber die Belastungsphase war mit 2 bis 4 Wochen insgesamt zu kurz, um einen steady state mit morphologischen Veränderungen zu erzeugen.

Die Abnahme der Myozytendichte ist als Zeichen stärkerer kardialer Hypertrophie bei der Gruppe der seneszenten SHR deutlicher als bei WKY.

#### 4.5.1. Verhältnis Kapillardichte /Myozytendichte

Die hier gewonnenen Verhältniszahlen liefern einen Anhaltspunkt für die Relationen im hypertrophen Herzen. Sie bestätigen die Ergebnisse von anderen<sup>97</sup>, daß sich der Quotient nicht wesentlich von 1 entfernt. Vergleichswerte finden sich oben. Eine besonders gute Kapillarisierung scheint dabei im Papillarmuskel gegeben, wenn man die Ergebnisse von Tab. 4 betrachtet. Offensichtlich ist der Grad der Kapillarisierung hier in einem Endstromgebiet des Herzmuskels mit stark gerichteter Struktur noch höher.

### Schlußfolgerung

Es scheint für die Kapillar-/Faserrelation einen Grenzwert zu geben. Jenseits dieser Marke ist entweder eine Neubildung von Kapillaren im Alter nicht mehr so leicht möglich oder wird mit den benutzten Methoden nicht erfaßt. Wenn eine verstärkte Nekrose von Kardiomyozyten im alternden Herzen stattfindet, so scheint dies nicht die Folge von mangelhafter Kapillarisierung zu sein. Die Pikrosiriusrot-Bilder lassen eher darauf schließen, daß zunächst eine Ummauerung der Myozyten mit

Kollagen eintritt und diese erst sekundär, wenn sie bereits von dem übrigen Funktionsgewebe und seiner Sauerstoffversorgung abgeschnitten sind verdämmern.

#### **4.6.1. CD 45**

Der hier verwendete monoklonale Antikörper des Clones OX 1 von Mausmyelomzellen ist gegen das Leukocyte-common antigen der Ratte gerichtet und wurde erstmals von Sunderland 1979 beschrieben <sup>98</sup>. Das hierzu benutzte Antigen ist ein Glykoprotein, das sich in der Membran von Rattenthymozyten findet. Es ist in seiner Funktion eine intrazytoplasmatische Tyrosinphosphatase und bei der Regulation der Leukozytenaktivierung und Entwicklung von B- und T-Lymphozyten beteiligt. Sein Molekulargewicht beträgt etwa 150 kDa., Isoformen von 180, 190, 200, 220, 240 kDa existieren. Es ist auf mehr als 95% der Thymozyten, Knochenmarkszellen und Zellen des Ductus lymphaticus vorhanden. Zur Gruppe von Zellen, die das Leukocyte Common Antigen CD 45 auf sich tragen, gehören B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten sowie die jeweils aktivierten Formen dieser Zelllinien.

#### **4.6.2. Weiße Blutzellen in der Blutbahn**

Als Anhaltzahlen für lymphoide Zellen im Blut der Ratte kann man etwa von 19,3% B-Lymphozyten, 67,7% T-Lymphozyten und einer T/B Ratio von 3,6 bei einer Gesamtzahl von  $140 \times 10^6$  ausgehen. Diese Zahlen wurden von Westermann et al.(1989) für männliche Lewis Ratten ermittelt. Innerhalb der verschiedenen Stämme gibt es jedoch nochmals eine teils große Variabilität. Zwar gibt es zwischen humanen Leukozytenantigenen und denen der Ratte viele Homologien. Das CD 45 Molekül auf Untergruppen von T-Lymphozyten (RC für restricted cluster) ist jedoch anders verteilt als bei humanen T-Zellen.

Vergleichswerte für die Bestimmung von pan CD 45 positiven Zellen finden sich nur wenige in der Literatur <sup>99</sup>. Holzinger zählte in menschlichem normalem ca 17 CD 45 positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> Herzgewebe, wobei etwa die Hälfte hiervon CD 4 positive T-Helferzellen waren. Diese Ergebnisse sind nicht ohne weiteres auf Ratten übertragbar, da sich schon die verschiedenen Fraktionen der Leukozyten des peripheren Blutes sehr vom Differentialblutbild im menschlichen Blut unterscheiden. Vergleichswerte für die Anzahl von CD 45 positiven Zellen im Rattenherz konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Die hier markierten Lymphozyten treten in Interaktion mit Adhäsionsmolekülen und Endothelzellen, dringen in das Herzgewebe ein, passieren es und treten über die Venen oder efferente Lymphknoten wieder aus. In der Phase des Transits können Sie aktiviert werden und beginnen sodann mit der Proliferation oder sie sterben z.B. durch Apoptose. Die Rekrutierung hängt also von lokalen Gegebenheiten ab. Der Turnover von B-Lymphozyten beträgt ca. 1-2% pro Tag bei einer Gesamtzahl von ca  $10^9$  <sup>100</sup>.

#### **4.6.3. Leukozyten im Gewebe**

Bei spontan hypertensiven Ratten und renovaskulär hypertensiven Ratten fand eine Arbeitsgruppe eine gesteigerte Anzahl von inflammatorischen Zellen in den fibrotischen Arealen der Herzen. Die Differenzierung der Zellen bei den renovaskulär hypertensiven Ratten zeigte, daß es sich hier hauptsächlich um T Helferzellen und Makrophagen handelte. Die Ansammlung zeigte sich vor allem perivaskulär gelegenen und in fibrotischen Arealen. Eine Untersuchung von Nicoletti benutzte hierzu Ratten im Alter von 1 Monat und 4 Monaten. Unterschiede im Sinne höherer Zahlen von inflammatorischen Zellen wurden hier auch im Vergleich zu Kontrollgruppen gefunden, die keine Hypertonus hatten <sup>101</sup> Hinglais fand bei 2 und 22 Monate alten Wistar bzw SHR die Anzahl der CD 4 Lymphozyten in fibrotischen Arealen erhöht <sup>26</sup>.

Auch andere Autoren berichten von einer verstärkten lymphozytären Infiltration in fibrotischem Gewebe <sup>102</sup>

#### **Schlußfolgerung**

Zusammenfassend läßt sich also schließen, daß die CD 45 markierten Zellen der jungen Ratten verglichen mit denen von seneszenten bereits im peripheren Blut Schwankungen in ihrer Zahl zeigen.

Das von uns im Herzen gefundene Ergebnis einer ca 30% Steigerung der im Gewebe zirkulierenden Leukozyten muß nicht im Widerspruch zu den im peripheren Blut gefundenen Werten aus der Literatur stehen. Da keine Differenzierung zwischen Granulozyten und Leukozyten stattfand, könnte man z.B. vermuten, daß ein höherer Anteil an Granulozyten im Gewebe zu finden ist, die evtl. eine stärkere Affinität zum Gewebe haben als Lymphozyten. Für die Bestimmung der CD 45 positiven Zellen muß man sich also fragen, ob die hier gefundenen Ergebnisse wirklich verstärkte immunologische Effekte der alternden Ratte abbilden oder ob eine Verschiebung der Subklassen hin zu einer mehr im Gewebe vorkommenden Art stattgefunden hat.

In der Auswertung zeigt sich hier teils eine leichte lokale Häufung. Es waren jedoch auch etliche Gesichtsfelder mit einer deutlich erhöhten Anzahl von positiven Zellen vorhanden, ohne daß sich in der Nähe ein größeres Gefäß befand. Hinweise für einen deutlichen Zusammenhang mit Clustern von Leukozyten, die auf eine vermehrte Abräumreaktion schließen ließen oder eine deutliche Häufung in fibrotischen Arealen ergaben sich morphologisch nicht für die seneszenten Tiere.

Dies führt zu der Aussage, daß sich im alternden Herzen der WKY und SHR die verstärkte Fibrose nicht eng mit einer gesteigerten immunologischen Reaktion assoziieren läßt, sondern auch unabhängig vom direkten Kontakt mit weißen Blutzellen abläuft. Der Widerspruch zu den Ergebnissen, die Nicoletti und Hinglais fanden, läßt sich nicht ganz auflösen. Was die perivaskuläre Häufung der weißen Blutzellen angeht, wie auch wir es fanden, so kann ihr Antreffen in dieser Lokalisation auch durch die Zugpfade erläutert werden, die diese Zellen, die sich ja aus dem peripheren Blutkreislauf rekrutieren, nehmen müssen.

#### **4.7.1. Apoptose**

Das Konzept der Apoptose geht auf eine Arbeit von Kerr, Wyllie und Currie aus dem Jahr 1972 zurück <sup>103</sup>. Als Apoptose wird der physiologische Zelltod bezeichnet, der für jede Zelle, die nicht mehr ihre Funktion erfüllt, entartet oder von fremden Organismen (v.a.Viren) infiziert ist, ein mögliches Schicksal darstellt. Dieser Mechanismus schützt einen vielzelligen Organismus davor, daß sich Krebs ausbreiten kann oder daß ein Virus, welches ja für seine eigene Vermehrung die Organellen der Zelle zur Proteinsynthese benötigt, sich von Zelle zu Zelle ausbreiten kann. Der Prozeß der Apoptose ist ein jeder Zelle zur Verfügung stehendes genetisches Programm, das nach äußeren Reizen als aktiver Prozeß von der Zelle selbst angestoßen wird. Er ist definiert als vereinzelte Auslöschung von Zellen, die in membranumhüllte Partikel verpackt werden, um sodann von anderen Zellen phagozytiert zu werden. Bei der Apoptose zerfällt die Erbinformation der Zelle, die im Chromatin gespeichert ist, zunächst in Bruchstücke von 300kb und 50 kb. Nach weiterer Spaltung durch Endonukleasen entstehen Bruchstücke von ca 180 Basenpaaren und zeigen so eine charakteristische Größenverteilung, wie sich in einer gelelektrophoretischen Auftrennung zeigen läßt (DNA-laddering).

Vorher entstehen vermehrt Einzelstrangbrüche der DNA. Um diese nachzuweisen □wird unter vielen anderen die hier benutzte In-situ nick-end labeling Methode benutzt, mit deren Hilfe Hydroxylgruppen am 3'Ende eines DNA-Stranges fluoreszenzmikroskopisch markiert werden können.

Der Gewebeschwund, der durch Apoptose entstehen kann, erreicht bis zu 25% pro Tag bei einer Apoptoserate von nur 2 - 3% <sup>104</sup>. Morphologisch unterscheidet sich der Prozeß der Apoptose, der ein energieverbrauchender streng regulierter Prozeß ist, deutlich von dem Zelltod durch Nekrose, einem Prozeß, der durch Streßfaktoren ausgelöst wird, die ein Überleben der Zelle unmöglich machen. Bei Apoptose kommt es zu einer Zellschrumpfung, Blasenbildung der Membran, Kondensierung des Kernmaterials, (dies wird anschließend durch Endonukleasen in Bruchstücke zerlegt) und die Zelle zerfällt in sogenannte apoptotische Körperchen (membranhüllte Körperchen). Dies läßt sich im Elektronenmikroskop zeigen. Die zerfallene Zelle wird dann ohne größere Entzündungsreaktion von umliegenden Makrophagen abgeräumt.

Verschiedene Autoren nehmen an, daß bei einem dauerhaft bestehenden Bluthochdruck nicht allein der passive Vorgang der Nekrose, sondern hauptsächlich die Apoptose von Kardiomyozyten im Herzen möglicherweise zu einem Verlust an kontraktile Zellen führt und somit eine Ursache für den Übergang einer kompensierten zu einer dekompenzierten Herzinsuffizienz darstellt <sup>105,106</sup>. Kajstura, der Fischer Ratten untersuchte fand eine zehnmal höhere Zahl von nekrotischen Zellen als apoptotische Zellen im linksventrikulären Myokard 3 und 24 Monate alter Tiere mit deutlicher ansteigender Tendenz bei den alten Tieren [1150 mit 3 Mo; 14500 mit 24 Mo.; Kajstura, 1996 #102]. Er schloß aus seiner Untersuchung, daß sich das alternde Herz hierdurch "verbraucht". Li zählte in Querschnitten von 18 bis 24 Monate alten nicht herzinsuffizienten SHR 8/100000 apoptotische Zellen gegenüber 38/1000000 bei herzinsuffizienten SHR und 2/100000 bei WKY unter Anwendung der nick-end labeling Technik. Olivetti und Anversa(s.o.) berichteten über eine ca. dreifache Erhöhung der Rate an apoptotischen Zellen bei Fischer Ratten von 24 Monaten. Fortuno und Ravasso beschrieben bei SHR in der Altersgruppe von 30 und 44 Wochen eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zur gleich alten Gruppe von WKY Ratten <sup>107,108</sup>. Nach Gabe von einem ACE-Hemmer oder AT1 Blocker berichten sie von einer Normalisierung der Apoptoserate im linken Ventrikel des Rattenherzens.

#### **4.7.2. Thesen zur Pathophysiologie der Apoptose**

Fortuno et al. <sup>107</sup> schlugen als pathophysiologischen Mechanismus vor, daß ein lokal überaktives Renin-Angiotensin-System zu einer Überexpression von Bax Oncoprotein, einem Induktor der Apoptose führen kann, und der Prozeß durch Blockade von AT I Rezeptoren aufgehalten werden kann. Ähnliche Ergebnisse jedoch mit Anwendung von ACE-Hemmern fanden Li et al. <sup>105</sup>. Alternative pathophysiologische Vorstellungen gehen von einer verstärkten Aktivierung der

EC-NOS als Ursache für eine erhöhte Apoptoserate aus und führen Versuche mit der Transfektion von humanem EC-NOS Gen in Rattenherzen als Begründung an<sup>109</sup>. Davon abweichende Vorstellungen gehen davon aus, daß Hypoxie mit anschließender Reperfusion und exzessiver mechanischer Streß den Anstoß für den Ablauf des Programmes der Apoptose geben<sup>110,111</sup>.

Auch bei Fischer Ratten wurde bei Untersuchung der DNase I-Aktivität von einer Zunahme beim Vergleich zwischen 3 und 24 Monate alten Tieren berichtet<sup>112</sup>. Andere, die ebenfalls die TUNEL Methode benutzten, fanden Unterschiede in der Empfindlichkeit des Herzens, wie es mit Apoptose auf eine Ischämie infolge Koronarokklusion reagiert, wenn diese bei erwachsenen und alten Fischer-Ratten induziert wird. Alte Herzen waren stärker von einer DNA-Fragmentierung betroffen<sup>113</sup>. Daß Ischämie alleine zu einer wesentlichen Erhöhung der Zahl von apoptotischen Kardiomyozyten führt, wird von einigen Autoren bestritten<sup>114</sup>. Sie fanden erst nach einer Reperfusionsphase eine Steigerung der Apoptose. Therapeutisch kann man die Rate apoptotischer Zellen, die bei Reperfusion nach längerer Myokardischämie auftreten, verringern indem man Betablocker wie Propanolol appliziert.

Eine dem oben zitierten Konzept entgegenstehende Hypothese geht von dem Begriff der seneszenten Zelle aus. Diese Zelle ist durch ihre Eigenart charakterisiert, daß sie sich differenziert hat, jedoch nicht mehr zur Teilung angeregt werden kann aber andererseits auch dem apoptotischen Prozeß entgeht<sup>115</sup>. Dies würde für ein postmitotisches Gewebe wie das Myokard bedeuten, daß der überwiegende Anteil des Gewebes doch durch Nekrose abstirbt.

Wenig ist bekannt über den zeitlichen Ablauf des Prozesses der Apoptose. Man kann jedoch davon ausgehen, daß der Vorgang innerhalb von 24 Stunden abgeschlossen ist.

Erstaunlich ist das Ergebnis von Li et al.<sup>105</sup> die bei SHR Ratten mit Herzversagen mit der gleichen Methode (TUNEL) im Mittel 39 apoptotische Kardiomyozyten pro  $10^5$  Kerne fanden, bei solchen ohne Herzversagen 8 apoptotische Herzmuskelzellen pro  $10^5$  Kerne. Dies deckt sich nicht mit den hier gefundenen Ergebnissen, daß keine apoptotischen Kardiomyozyten aufgefunden wurden.

Man muß sich vergegenwärtigen, daß bei einer ca. 300 fachen Vergrößerung ( $1 \times 5 \times 65$ ) gut geschätzt ca. 100 Myozyten pro Gesichtsfeld im Querschnitt zu erkennen sind. Es wären mindestens 1000 Gesichtsfelder durchzumustern um 2 TUNEL-positive Kardiomyozyten zu entdecken.



### 4.7.3. Nekrose

Im Unterschied zur Apoptose stellt die Nekrose ein Absterben der Zelle dar, als passiven Prozeß, der von außen durch eine irreversible Schädigung bewirkt wurde, wie es bei einer Entzündung, UV-Bestrahlung, Hyperthermie, Einwirken von Stoffwechselgiften oder einem Mangel an Sauerstoff vorkommt. Im Körper unherwandernde Immunzellen sammeln sich um nekrotische Zellen herum an und helfen den Herd zu begrenzen. Da die Zelle im Zustand des Sauerstoffmangels ihren Wasser- und Elektrolythaushalt nicht mehr aufrecht erhalten kann, schwillt sie durch Wassereinstrom an und zerplatzt schließlich. Der Zellschutt, der durch das Zerplatzen der Zellmembran und anschließende Entleeren der Zelle entsteht, wird mit Hilfe von Freßzellen abgeräumt. Hier finden sich vor allem weiße Blutkörperchen (Lymphozyten) neben Monozyten und Makrophagen, meist verbunden mit einer Bindegewebsreaktion und vermehrter Fibrose.

Vermutlich bestehen beide Prozesse nebeneinander und laufen gleichzeitig ab. Zur Frage des nekrotischen Zellunterganges von Kardiomyozyten fanden Thiedemann et al 83.<sup>42</sup> in Ihren histologischen Präparaten keinen Anhalt bei SHR und Goldblatt-Ratten im Alter von 20 Monaten. Auch eine inflammatorische Antwort wurde hier nicht gesehen.

### 4.7.4. TUNEL -Methode

Die sogenannte TUNEL-Methode (Deoxynucleotidyltransferase vermittelte Deoxyuridin Triphosphat-Biotin nick end labeling) ist eine eingeführte Methode zur Darstellung von Doppelstrang- und Einzelstrangbrüchen der DNA, die letztlich zum Absterben der Zelle führen, wenn die Reparaturmechanismen der Zelle nicht greifen. Eine synonyme Bezeichnung ist in situ nick-end labeling Methode. Praktisch bedeutet dies, daß bestehende Doppelstrangbrüche mit markierten Nukleotiden verlängert anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern sichtbar gemacht werden. Sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche werden erkannt. An anderen Methoden existiert z.B. das DNA-laddering, das im Gewebehomogenat zur Detektion der Apoptose eingesetzt werden kann. Nur wenige davon sind jedoch für die Anwendung am Gewebeschnitt geeignet, um gleichzeitig etwas über die Herkunft der apoptotischen Zellen zu erfahren. Komplizierend kommt hinzu, daß manche Methoden, wie z.B. die Färbung mit Propidiumjodid oder Hoechst Farbstoff 33342 zwar an Zellkulturen die Differenzierung nichtapoptotischer von apoptotischen Kernen ermöglichen, diese Methoden sind jedoch nicht bei Gewebeschnitten anwendbar. Kritiker der Methode<sup>116</sup> haben zu bedenken gegeben, daß sich mit dem oben beschriebenen Verfahren keineswegs nur

die apoptotischen Zellen darstellen lassen, sondern daß sich ebenso Zellen darstellen, die sich zum Beobachtungszeitpunkt in der Phase der Transkription befinden und ihre Erbinformation sich daher in einem Zustand befindet, in dem Einzelstrang-DNS ablesbar ist. Sie halten die Methode zwar für selektiv aber nicht für spezifisch. Zur Kontrolle schlagen sie die gleichzeitige Anwendung mehrerer Methoden zur Detektion von apoptotischen Zellen vor, entweder morphologische Kriterien, wie sie durch die elektronenmikroskopische Untersuchung erzielt werden können oder Marker der Transkription wie z.B. Marker der Splicing Komponente SC35.

Nach Untersuchungen in hiesigen Institut, die bei dilatativ cardiomyopathischen humanen Herzen als zusätzliche Methode den Verlust an Lamin B Markierung der Zellkerne betrachteten<sup>117</sup> war prozentual nur ein geringer Unterschied zwischen den quantitativen Ergebnissen der TUNEL-Methode im Vergleich zur Rate an Kernen mit Verlust von Lamin zu erkennen. Die Ergebnisse bewegten sich in der Größenordnung von 1,3% der Myozytenkerne pro Jahr, wenn man für den Ablauf des apoptotischen Prozesses eine Zeitdauer von 24h ansetzte.

Andere interstitiell befindliche Zellen, wie Gewebemakrophagen, Fibroblasten, gefäßwandadhärente Lymphozyten und Granulozyten des Blutes werden mit der Methode dann ebenfalls erfaßt, wenn sie der Apoptose anheim fallen. Die Rate für die Apoptose an Kardiomyozyten, die von verschiedenen Autoren für verschieden pathologische Zustände des Herzens angegeben wird variiert sehr stark, nämlich von 0 bis 28% bei arrhythmogenen rechtsventrikulären Dysplasien. Einigkeit besteht jedoch dahingehend, daß in normalem Herzgewebe nahezu keine apoptotischen Kardiomyozyten zu finden sind.

#### **4.7.5. Apoptose und der Alterungsprozeß**

Heutige Theorien des Alters gehen von zwei Hypothesen aus: 1) Altern ist ein Prozeß, der in unserem genetischen Programm festgelegt ist so wie das Wachstum und die Entwicklung. 2) Altern ist die Folge von Beanspruchung und Funktion im Sinne einer Abnutzungstheorie. Als Beweise werden hier die Prozesse des genetisch determinierten Zelltodes, der Apoptose angeführt.

Ein Grundproblem bei der Beschreibung pathologischer Prozesse des Alterns ist zunächst die Definition der "normalen" Prozesse des Alterns. Als Definition für die normalen Altersprozesse kann gelten, daß normale Altersprozesse Verschlechterungen der Funktion von Organen darstellen, wie sie bei gesunden physisch aktiven Individuen auftreten. Abnahmen in der kardiovaskulären

Leistungsfähigkeit können bereits eine Folge von kurzzeitiger körperlicher Inaktivität oder einer ungesunden Ernährung sein. Das alternde Herz hat als physiologische Eigenschaften eine geringere Fähigkeit zur diastolischen Füllung<sup>118</sup>. Dies ist nach echokardiographischen Untersuchungen beim Menschen aber nicht nur der Fall für die hypertrophen Herzen sondern auch für die nichthypertrophen alternden Herzen zutreffend(s.o.). Als Ursache dieser Entwicklung wird zum einen eine Abnahme des kontraktiles Materiales, zum anderen eine Akkumulation von nicht mehr dehnungsfähigem Bindegewebe in Form von Kollagen I und III angeschuldigt. Man kann als gesicherte Tatsache ansehen, daß sich das Herzgewicht im Alter sowohl bei dem hier untersuchten Tiermodell, wie auch beim Menschen erhöht. Als Vergleichsgruppe zur Untersuchung von Veränderungen, die altersbedingt auftreten, sollte man adulte Ratten mit mehr als 12 Monaten betrachten, da sich bei jüngeren Tieren noch Wachstumsprozesse abspielen, die die Betrachtung verzerren können. Die Auswahl des Stammes kann natürlich auch wieder einen Einfluß haben. Im Gegensatz zu dem hier benutzten Stamm der WKY-Ratte fand sich nämlich bei dem Vergleich von adulten Sprague-Dawley-Ratten mit seneszenten Tieren von 25 Monaten eine gleichbleibende Kapillarisation und ein gleichbleibendes Körper- und Herzgewicht<sup>62,119</sup>.

#### **4.7.6. Alter und Proteinsynthese**

Biggs und Booth gingen der Frage nach, ob sich im Alter insgesamt eine verminderte Proteinsynthese einstellt. Am Herzen von Fischer Ratten im Alter von 12 Monaten und zwei Jahren fanden sie bei Bestimmung der basalen und Trijodthyronin-stimulierten RNA Konzentration des Herzens keine Unterschiede. Sie schlossen daraus, daß Altern keine Herunterregulierung der Proteinsyntheserate mit sich bringt<sup>120</sup>.

In jeder Zelle existieren Reparaturmechanismen um Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche in der DNA zu entfernen, die z.B. durch oxidative Prozesse entstehen. Einzelstrangbrüche, die relativ häufig auftreten, werden mit einer hohen Geschwindigkeit repariert, ca.  $2 \times 10^5$  pro Stunde<sup>1</sup>. Doppelstrangbrüche stellen ein eher seltenes Ereignis dar. Beide Stränge sind an der gleichen Stelle defekt. Bleiben diese Doppelstrangbrüche für einen Zeitraum von mehr als zwei Stunden ohne Reparatur bestehen, so bedeutet dies für das Schicksal der Zelle den Tod<sup>121</sup>. Die normale Frequenz für Einzelstrangbrüche wird mit 8,8/Zelle/Tag angegeben. Manche postulieren, daß es zu einer Vermehrung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen kommt, die nicht mit adäquater Geschwindigkeit repariert

werden. Andere konnten zeigen, daß Enzyme, die mit der DNA-Reparatur in Verbindung stehen eine unveränderte Aktivität im Alter besitzen <sup>122</sup>.

In vitro Versuche mit Fibroblastenkulturen. Hierzu fanden sich zum Teil widersprüchliche Ergebnisse was die Reparaturmechanismen für Einzelstrangbrüche betrifft<sup>1</sup>. Hanawalt et al. gaben zu bedenken, daß es unter Umständen nicht die Gesamtzahl der DNA Defekte ist, die einen Einfluß hat, sondern die jeweils relevanten Gene in einem Gewebe, die wichtig für seine Funktion sind, betrachtet werden müssen <sup>123</sup>. Eine Reihe von DNA Brüchen könnten unrepariert bleiben ohne einen Verlust der Zellfunktion nach sich zu ziehen.

Versuche zur Untersuchung des Zusammenhanges der Lebensspanne mit chromosomalen Aberrationen an Herzzellen von jungen und adulten Ratten zeigten bei einer Exposition gegenüber UV-Strahlen einen kompletten Verlust der Reparaturfähigkeit von adulten Zellen <sup>124</sup> Bei der Untersuchung eines anderen postmitotischen Gewebes der Ratte, dem Gehirn fand sich keine Veränderung der spontanen DNA Bruchrate, während in der Leber ein zweifacher Anstieg von 6 Monaten auf 36 Monate zeigen ließ <sup>125</sup>

Die Ergebnisse müssen mit Vorsicht gewertet werden, da ein Unterschied in der Basisrate von Reparaturmechanismen und einer stimulierten Reparatur besteht.

Für die hier gesehenen apoptotischen Zellen kann gesagt werden, daß sie in der weit überwiegenden Zahl dem Interstitium zuzuordnen sind, wenige lagen intravaskulär. Kardiomyozyten waren nie mit einer positiven Markierung zu finden.

### **Schlußfolgerung**

Die Hypothese, daß das Herz durch einen zunehmenden Zelluntergang an kontraktilen Zellen in einem wesentlichen Prozentsatz verliert, muß zumindest für die hier untersuchten Herzen von Spontan Hypertensiven Ratten und WKY bei normalen Lebensbedingungen ohne zusätzliche Ischämie verworfen werden. Ein apoptotischer Prozeß spielt sich im wesentlichen hier nur im Interstitium ab und dürfte einem physiologischen Geschehen entsprechend dem turnover von weißen Blutzellen entstammen.

#### **4.8.1. ACE (Angiotensin-Converting-Enzym)**

Im normalen Rattenherzen wurde immunhistochemisch eine ACE-Bindung (monoklonaler Antikörper 9B9) im vaskulären Endothel, am Endothel der Herzklappen und in vereinzelter Regionen des Endokards gefunden <sup>126</sup>. Daneben

wird es im Rahmen von Reparaturvorgängen in Myofibroblasten exprimiert, die verstärkt nach Infarzierungen auftreten <sup>127</sup>.

Das Angiotensin Converting Enzym ist ein vor allem in der Lunge vorkommendes Enzym, das die Katalyse von Angiotensin I in Angiotensin II bewirkt. Angiotensin I wird in der Niere aus Renin gebildet. Durch adrenerge nervale Stimulation wird die Niere zu einer höheren Reninproduktion angeregt. Vermehrt bereitgestelltes Renin wird über eine Zwischenstufe (Umwandlung zu Angiotensin I) zu Angiotensin II. Angiotensin II vermittelt über seine Geweberezeptoren in der Niere eine vermehrte Natriumrückresorption und gesteigerte Vorlast des Herzens, sowie eine direkte Hypertrophie der Kardiomyozyten und führt so zu einer Leistungsanpassung des Herzens an eine erhöhte Belastung.

In der Phase der Herzinsuffizienz wird die Rezeptorzahl für AngII vermindert, während das zirkulierende Ang II deutlich erhöht ist.

#### **4.8.2. AT II und Fibrose**

Die dauerhafte Applikation des Transmitters Angiotensin II verursacht bei Ratten eine erhöhte Fibrose des Herzens <sup>128</sup>. Es greift wahrscheinlich in den Umsatz des Kollagens ein der durch Fibroblasten geregelt wird. Als second messenger dient intrazelluläres Calcium. Wegen der gesehenen positiven Effekte auf Myofibroblasten im Sinne von niedrigerer Hydroxyprolinkonzentration und niedrigerer Volumenfraktion des Kollagens (Sirius-Red Färbung mit Videodensitometrischer Auswertung) bei einer Calciumkanalblockade werden von Sun et al. Calciumblocker als kardioprotektive Substanz vorgeschlagen.

Myofibroblasten exprimieren neben ACE, Typ I Collagen mRNA und AT1 Rezeptoren. So wurde die lokale Angiotensin II Produktion als autokriner Mechanismus verstanden, dessen sich die Myofibroblasten bedienen, um den Kollagenumsatz zu regeln. Sie sind vermutlich auch der Ansatzpunkt für die Wirkung von ACE-Hemmern, von denen bekannt ist, daß sie die Kollagenproduktion im Herzen hemmen können <sup>129</sup>. In gewissem Widerspruch hierzu war eine Behandlung mit ACE-Hemmern von alten (24 Monate) männlichen SHR bezüglich der Reduktion von Fibrose nicht erfolgreich, konnte jedoch die linksventrikuläre Hypertrophie reduzieren und die klinischen Anzeichen von Herzinsuffizienz nach deren Beginn verbessern <sup>18</sup>.

Sun fand in autoradiographischen Studien am Rattenherzen die Bindungsdichte von ACE in Arealen verstärkter Fibrose erhöht, unabhängig von zirkulierendem

Angiotensin II <sup>130</sup>. Neben perivaskulärer Fibrose lag auch ein microscopic scarring in beiden Ventrikeln nach Ang II Applikation vor.

#### **4.8.3. ACE und Metalloproteinasen**

Der lang postulierte Gedanke, daß eine verstärkte Fibrose durch übermäßige Bildung von Kollagen bewirkt würde, erhielt mit der Entdeckung von Metalloproteinasen, die einen Abbau des Kollagens bewirken einen neuen Aspekt. Möglicherweise bewirkt erst eine verminderte Kollagenolyse die vermehrte Fibrose.

#### **4.8.4. ACE und TGF- $\beta_1$**

In Kokulturen, die Myozyten mit Fibroblasten enthielten, war nach Stimulation mit Angiotensin II neben einer deutlichen Hypertrophie eine vermehrte parakrine Freisetzung von TGF- $\beta_1$  von Fibroblasten gefunden worden.

Aus diesen in vitro Experimenten schlossen die Autoren, daß auch in vivo die Wirkung von AngII durch TGF- $\beta_1$  vermittelt wird <sup>131,132</sup>.

### **Schlußfolgerung**

Das hier gefundene Ergebnis einer im Grunde gleichen Lokalisation von ACE positiven Arealen im Bereich der großen Gefäße und des rechten Ventrikels bei SHR und WKY macht hinsichtlich der Aktivität des Enzymes noch keine Aussage, die durchaus bei beiden Stämmen recht unterschiedlich sein kann. Eine Untersuchung der Enzymaktivität im Gewebeschnitt müßte jedoch mit anderen Methoden erfolgen. Neben den biochemischen Ansatzpunkten wäre eine mittels des Laserscanning-Mikroskopes zur ermittelnde Bestimmung der Fluoreszenzhelligkeit im Gewebeschnitt denkbar. Auf diesem Weg könnte die Ortsinformation mit der biochemischen Information kombiniert werden.

#### **4.9.1. TGF- $\beta_1$ (transforming growth factor)**

Zur Superfamilie der TGF- $\beta$  gehören die Isoformen des Wachstumsfaktors TGF- $\beta_1$ - $\beta_3$ , sowie Activin/Inhibin und einige andere Wachstumsfaktoren. TGF- $\beta_1$  ist ein Homodimer aus zwei 12,5kD Polypeptiden.

TGF- $\beta_1$  wird als multifunktionales Zytokin verstanden, das in Wachstum und Differenzierungsprozesse vieler Zelltypen eingreift. Die Produktion in der Endothelzelle, den glatten Muskelzellen der Gefäße oder in Fibroblasten wird durch

biophysikalische Kräfte angeregt und durch Vasokonstriktoren. Aber auch andere, sogar die meisten Zellen können es produzieren. Für Zustände wie bei Bluthochdruck wird die Gentranskription für TGF- $\beta$  hochreguliert<sup>133</sup>. Das Prekursorprotein hat ein ungefähres Molekulargewicht von 55kD, während die aktivierte Form noch etwa 18 kD hat. Überraschenderweise war bei Induktion einer Druckhypertrophie des linken Ventrikels das Prekursorprotein deutlich erhöht im Gewebe nachweisbar, die aktivierte Form von TGF- $\beta_1$  jedoch auch in Gewebelysaten durch Immunoblots so gut wie nicht nachweisbar<sup>134</sup>. Gemeinsam mit anderen Stimuli bewirkt der Wachstumsfaktor eine erhöhte Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix und vielleicht auch der  $\beta$ -Myosin Schwereketten als zellulärem Protein<sup>135</sup>. Es potenziert nach Meinung von Agrotis<sup>136</sup> die proliferativen Effekte anderer Wachstumsfaktoren in glatten Muskelzellen bei SHR, während es diese Effekte bei WKY hemmen soll. Andere Autoren fanden bei cardiomyopathischen Hamstern auch ohne eine erhöhte mechanische Stimulation nach dem 90. Lebensjahr bereits eine dreifach erhöhte Konzentration von TGF- $\beta_1$  in Northern und Western blot Untersuchungen<sup>137</sup>.

Interessanterweise war beim versagenden hypertrophen Herzen nach Entlastung ebenfalls eine Hochregulierung von TGF- $\beta_3$  zu sehen, als die mRNA Transkripte beim Rattenherzen untersucht wurden. TGF- $\beta_1$  zeigte jedoch keine signifikanten Veränderungen der mRNA Transkripte. So könnten also auch gegensätzliche Auslöser zu ähnlichen Veränderungen führen. Auch Nicoletti et al. fanden bei renovaskulären Ratten von 1 und 4 Monaten keine wesentlichen Veränderungen der mRNA Transkripte, als sie diese mithilfe der RT-PCR untersuchten<sup>101</sup>.

Immunhistochemische Lokalisierungen des Transmitters waren je nach Isoform nach Li und Brooks am Kardiomyozyten etwas unterschiedlich. Für TGF- $\beta_1$  fanden sie eine Markierung der intercalated disks, der Sarkolemmmembran und des Zytoplasmas im linken Ventrikel des Rattenherzens, sowie bei Ratten die eine aortic banding erhalten hatten im Bereich der Nuklei<sup>134</sup>.

Di Nardo interpretiert die TGF- $\beta_1$  Erhöhung als Reexpression eines embryonalen Genprogrammes. In Monozyten des peripheren Blutes von hypertonen Patienten wurde ebenfalls eine erhöhte Konzentration gefunden im Vergleich zu normotensiven Patienten. Eine Rolle von TGF- $\beta$  in den strukturellen Veränderungen des Hypertensiven Herzens wurde vermutet.<sup>138</sup> Schon nach kurzer Zeit fand sich bei jungen 1,2 und 3 Wochen alten Ratten mit einer durch aortic banding induzierten Druckhypertrophie eine Hochregulierung der Transkriptionsfaktoren für TGF- $\beta_1$ <sup>139</sup>. Versuche an Zellkulturen, bei denen unter anderem glatte Muskelzellen von Gefäßen und Fibroblasten mit einem für TGF- $\beta$  kodierenden Adenovirus infiziert wurden, zeigten neben einer verstärkten

Produktion von TGF- $\beta$  auch eine Überexpression des Kollagen III- Genes, so daß sich hieraus mögliche Rückschlüsse für in vivo Effekte ziehen lassen <sup>139</sup>. In vitro Versuche anderer ergaben nach Stimulation durch Norepinephrin und Angiotensin II in neonatalen Rattenfibroblasten eine höhere Sekretion des TGF- $\beta$  <sup>140</sup>. Andere schlugen als Mechanismus eine parakrine Stimulierung von Myozyten durch das von Fibroblasten gebildete TGF- $\beta$  vor, während die Fibroblasten selbst durch Ang II zur vermehrten TGF- $\beta$  Freisetzung stimuliert würden <sup>132</sup>. Bei gemeinsamer Anwendung von Norepinephrin und AngII fiel die Rate der Produktion allerdings wieder.

Auch bei alten (18 bis 24 Monate) SHR mit beginnendem Herzversagen fanden sich erhöhte mRNA Level für TGF- $\beta_1$  die eine regulierende Rolle für dieses Zytokin nahelegen. Das Herzversagen konnte durch eine Behandlung mit Captopril verhindert werden <sup>141</sup>. Auch für die Anwendung von AT 1 Rezeptorenblockern wurde eine Hemmung der Genexpression von TGF- $\beta_1$  für SHR im Alter von 22 bis 32 Wochen beschrieben neben der von Proteinen der Extrazellulären Matrix <sup>142</sup>.

Eine Dauerinfusion von Isoproterenol produzierte bei männlichen Wistar-Ratten ebenfalls nach drei Tagen einen erhöhten Level an mRNA für TGF- $\beta_1$ . Der Effekt konnte durch Propanolol antagonisiert werden <sup>143</sup>.

In einem anderen Modell mit (transmuralem) Myokardinfarkt fand sich vier Wochen nach Infarkt eine Kolo-kalisation von ACE, AngII und TGF- $\beta_1$  mit erhöhter Kollagen Genexpression. Die ACE, AngII und TGF- $\beta_1$  Rezeptorbindung war deutlich erhöht, wie auch die TGF- $\beta$  Konzentration.<sup>144</sup>. Der Schluß hieraus war, daß es vermutlich einen Zusammenhang zwischen lokal produziertem AngII über die Bindung an AT1-Rezeptoren mit der erhöhten TGF- $\beta$  Konzentration gibt, da die TGF- $\beta$  Genexpression mit Losartan, einem AT1 Antagonisten gehemmt werden konnte.

Im Modell des Reperfusionsschadens am Hundeherzen war eine verminderte Infarktgröße erkennbar, wenn die Tiere mit TGF- $\beta$  vorbehandelt worden waren, so daß eine für das Endothel hinsichtlich seiner Permeabilität schützende Wirkung postuliert wurde <sup>145</sup>.

Intraventrikulär verabreichtes TGF- $\beta_1$  wurde mit einer Reduktion des Infarktvolumens bei einer fokalen Hypoxie/Ischämie des Gehirns bei Ratten in Zusammenhang gebracht, wenn es zwei Stunden nach Hypoxie verabreicht wurde <sup>146</sup>. Auch nach einer Applikation von myokardialer Ischämie wurde über kardioprotektive Effekte berichtet <sup>147</sup>.



Es scheint, daß viele Wachstumsfaktoren durch eine Interaktion mit Tyrosin Kinase Rezeptoren eine Signaltransduktion bewirken können und eine intrazelluläre Reaktionskaskade anstoßen können, die für das Überleben der Zelle wichtige Gene anschalten und durch deren Genprodukte ein programmiertes Überleben der Zelle gewährleisten. Solche Genprodukte beinhalten Enzyme, die als Fänger freier Radikale wirksam sind, calciumbindende Proteine und anti-apoptotische Proteine .

TGF- $\beta$  spielt eine Rolle in der Regulation und Supression von iNOS indem es die Induktion und Translation von iNOS mRNA sowie die Stabilität des iNOS Proteins vermindern kann <sup>148</sup>.

Andere Untersucher die ebenfalls der Frage nachgingen ob sich während des Alterns eine verstärkte Expression von TGF- $\beta$  im Zusammenhang mit verstärkter Fibrose einstellen könnte, fanden zwar eine altersunterschiedliche Produktion von Kollagen I und III aber insgesamt keine wesentlichen Unterschiede wenn sie die Transkripte von TGF- $\beta$ 1 und 3 im linken und rechten Ventrikel von 2 bis 19 Monate alten Sprague Dawley Ratten mittels Northern Blot untersuchten.

Die durch semiautomatische Bildverarbeitung untersuchte Bildung von Kollagen mittels Picrosiriusrotfärbung war hier im Alter bis zu 19 Monaten leicht erhöht wie bereits oben erwähnt <sup>149</sup>.

### **Schlußfolgerung**

Das Ergebnis einer nicht wesentlich erhöhten quantitativen Häufung von TGF- $\beta$ 1 positiven Zellen im Herzen von SHR und WKY Ratten mit deutlicher Fibrose kann als Hinweis gelten, daß hier andere Mechanismen einen größeren Effekt ausüben. Sicher ist dies jedoch nicht, da über die Menge des freigesetzten Zytokines keine Informationen gewonnen wurden, so daß es durchaus denkbar erscheint, daß schon geringe Mengen eine Auswirkung haben. Dies würde sich der mikroskopischen Untersuchung entziehen. Andere Methoden der Quantifizierung wie ELISA oder Western-blot Analyse können diesen Nachweis unter Umständen führen.

#### **4.10.1. acidic FGF (Fibroblast Growth Factor)**

Die Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren besteht aus sieben strukturverwandten Proteinen. Acidic FGF (aFGF) ist ein 16kD Polypeptid das sich unter anderem im Hirn von Mammalia findet <sup>150</sup>. Während der Organogenese ist es im Rattenherzen sowohl in den Myozyten cytoplasmatisch nachweisbar, wie auch in der extrazellulären Matrix (11-20.Gestationstag). Die Mesenchymzellen und Endothel- sowie Endokardzellen färben sich in dieser Phase ebenfalls positiv an.

Mit zunehmender Zelldifferenzierung wird es nicht mehr nachweisbar in den Koronararterien<sup>151</sup>. aFGF regt die Teilung von Zellen an, die sich aus dem Mesoderm gebildet haben. Kardiomyozyten sind mesodermaler Herkunft, sie teilen sich während ihrer Entwicklung nur in der embryonalen und fetalen Phase, so daß sich für die Phase der Organogenese eine Funktion von aFGF vermuten läßt<sup>152</sup>.

Für die Maus ist das Gentranskript charakterisiert worden<sup>152</sup>. Acidic FGF wirkt in vivo als Faktor, der das Wachstum von Gefäßen stimuliert. Neunzig Prozent der Kapillaren des linken Ventrikels werden im neonatalen Stadium gebildet<sup>153</sup>. Fetale und embryonale Herzen zeigten eine immunhistochemisch starke Markierung der Kardiomyozyten. Mit zunehmendem Alter verlor sich diese Markierung in den Myozyten. Dagegen waren die Gefäße jedoch deutlich markiert. Die Vermutung lag nahe, daß Kardiomyozyten lokal parakrin aFGF produzieren und so das Gefäßwachstum des Herzens aktivieren<sup>154</sup>.

Lokal perivaskulär appliziertes aFGF bewirkte bei einem Ischämiemodell von Yorkshire Schweinen nach Ameroid-Konstriktor-Verengung von Koronararterien einen verbesserten Blutfluß im Gefäßgebiet des Herzens, das von der relativen Ischämie betroffen war<sup>155</sup>. Dagegen hatte eine ähnlicher Versuchsaufbau bei Hunden keinen positiven Effekt<sup>156</sup>.

Auch im Ischämie-Reperusionsmodell der Ratte wurde über einen positiven Effekt nach Gabe von aFGF auf den Anteil des überlebenden Myokards berichtet, wenn es als systemischer Bolus direkt nach der Ischämie gegeben wurde<sup>157,158</sup>. Die Autoren vermuteten, daß vielleicht eine verbesserte Perfusion hierfür verantwortlich sei.

### **Schlußfolgerung**

Da bei den hier untersuchten Tieren nur einzelne Zellen eine Anfärbung in der Immunfluoreszenz zeigten, läßt sich hieraus im Vergleich zum in der Literatur beschriebenen sehr reichhaltigen Vorkommen in der Phase der Organogenese ableiten, daß die mitogene Wirkung von aFGF nach der Geburt nur noch eine geringe ist. Diese Aussage muß jedoch auf das hier benutzte Tiermodell eingeschränkt werden. Andere pathologische Zustände des Herzens mit Ischämie können durchaus eine stärkere Expression von aFGF zeigen.



## 5. Zusammenfassung

In einer kleinen Serie überprüften wir am Herzen mit morphometrischen Verfahren beim Tiermodell der Spontan Hypertensiven Ratte ( $n = 26$ ) im Vergleich zu Kontrollgruppen von Wistar Kyoto Ratten ( $n = 29$ ) wie sich der Einfluß von kurzandauerndem Lauftraining (bis zu 4 Wochen) und von Altern auf Parameter wie Fibrose, Myozytenbreite, Kapillardichte, Myozytendichte auswirkt. Darüberhinaus wurde betrachtet ob sich im Herzgewebe mittels immunhistochemischer Verfahren ein Unterschied im Hinblick auf die Verteilung von Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$  aFGF), Angiotensin Converting Enzym, Leukozyten und Apoptoserate finden ließ.

Als Hauptresultate fanden wir in den morphometrischen Messungen eine signifikante Zunahme der Fibrose bei seneszenten Rattenherzen im Vergleich zu jungen und adulten Tieren von Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) aber auch WKY neben einer Zunahme der Myozytenbreite und Abnahme der Kapillardichte. Das Verhältnis Kapillardichte zu Myozytendichte veränderte sich nicht signifikant und schwankte gering um den Wert 1:1. Kurzdauerndes Training bewirkte weder bei SHR- noch bei WKY-Herzen eine deutliche Veränderung der morphometrisch erhobenen Parameter.

Hinsichtlich der immunhistochemisch erhobenen Parameter war festzuhalten, daß TGF- $\beta_1$  - positive und aFGF – positive Zellen nur sehr selten im Gewebe von jungen adulten und seneszenten Tieren zu finden sind. Die Verteilung von ACE positiven Arealen unterschied sich bei WKY und SHR nicht. Apoptotische Kerne fanden sich in Kardiomyozyten nicht, sondern lediglich im Interstitium. CD 45 positive Leukozyten lagen mit höherem Alter häufiger im Rattenmyokard vor, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Ein klarer Hinweis auf ein entzündliches Geschehen oder eine hohe Rate apoptotischer Muskelzellen im Myokard von SHR oder WKY-Ratten ließ sich somit nicht ableiten.

Die beiden untersuchten Rattenstämme unterschieden sich im wesentlichen bei den morphometrischen Parametern (Fibrose, Kapillardichte und Myozytendichte), ohne daß sich dies in statistisch signifikanten Unterschieden niederschlug.

Die Auswirkungen der spontanen arteriellen Hypertonie zeigen sich bei der Ratte am deutlichsten in der Phase der Seneszenz und tragen zur Herzinsuffizienz bei.

## Summary

We tested in a small series of cardiac tissue from spontaneously hypertensive rats ( $n = 26$ ) with regard to control groups of Wistar Kyoto rats ( $n = 29$ ) how the influence of short term running and ageing could change morphometrical parameters like fibrosis, myocyte width, capillary density and myocyte density. Furthermore we searched for differences in the distribution of growth factors (TGF- $\beta_1$ , aFGF), angiotensin converting enzyme, leukocytes and rate of apoptosis with immunohistochemical tools.

As main results of morphometrical data we found a significant increase of fibrosis in hearts of senescent spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar Kyoto compared to young and adult rats as well as an increase in myocyte width and a decrease in capillary density. The ratio between capillary density and myocyte density was not altered significantly and varied only little from 1:1. Short term training did not induce a clear change of morphometrical parameters neither in SHR - nor in WKY-hearts.

With regard to the immunohistochemical parameters we could very rarely detect TGF-  $\beta_1$  - positive and aFGF – positive cells in the tissue of young and senescent rats. The distribution of ACE positive areas did not differ between WKY and SHR. Apoptotic nuclei could not be detected in cardiomyocytes but only in interstitial space. CD 45 positive leukocytes were more numerous in the hearts of animals with higher age but the differences were not significant. Thus we had no clear evidence of an inflammatory process or a high rate of apoptosis in the myocardium of SHR or WKY rats.

The inbred rat strains showed their main differences in the morphometrically detected parameters (fibrosis, capillary density and myocyte density) without a statistically significant difference.

The impact of spontaneous hypertension in the rat shows most prominently in the phase of senescence and contributes to cardiac failure.

## 6. Literatur

1. Alvaro Macieira-Coelho. Molecular basis of aging. In: eds. *Molecular basis of aging*. Boca Raton: CRC Press; 1995: 157.
2. Anversa P, Hagopian M, Loud AV. Quantitative radioautographic localization of protein synthesis in experimental cardiac hypertrophy. *Lab Invest*. 1973;29(3):282-292.
3. Brilla CG, Reams GP, Maisch B, Weber KT. Renin-angiotensin system and myocardial fibrosis in hypertension: regulation of the myocardial collagen matrix. *European Heart Journal*. 1993;14:57-61.
4. Breisch EA, White FC, Nimmo LE, Bloor CM. Cardiac vasculature and flow during pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol*. 1986;251:H1031-H1037.
5. Brooks WW, Bing OHL, Conrad CH, O'Neill L, Crow MT, Lakatta EG, Dostal DE, Baker KM, Boluyt MO. Captopril modifies gene expression in hypertrophied and failing hearts of aged spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:1362-1368.
6. Brilla CG, Maisch B, Weber KT. Myocardial collagen matrix remodelling in arterial hypertension. *Eur Heart J*. 1992;13:24-32.
7. Breisch EA, Bove AA, Phillips SJ. Myocardial morphometrics in pressure overload left ventricular hypertrophy and regression. *Cardiovasc Res*. 1980;14:161-168.
8. Ferrans VJ. Morphology of the heart in hypertrophy. *Hospital Practice*. 1983;18:67-78.
9. Gareth G. *Fine Structure Immunocytochemistry*. Berlin, New York: Springer Verlag; 1993

10. Bashey RI, Donnelly M, Insinga F, Jimenez SA. Growth properties and biochemical characterization of collagens synthesized by adult rat heart fibroblasts in culture. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1992;24:691-700.
11. Robinson R. *Cardiac myocyte-connective tissue interactions in health and disease*. Karger; 1990
12. Ivarsson M, McWhirter A, Borg TK, Rubin K. Type I collagen synthesis in cultured human fibroblasts: regulation by cell spreading, platelet-derived growth factor and interactions with collagen fibers. *Matrix Biology*. 1998;16:409-25.
13. Agocha A, Lee HW, Eghbali-Webb M. Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth factor-beta1, thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1997;29:2233-44.
14. Agocha A, Sigel AV, Eghbali-Webb M. Characterization of adult human heart fibroblasts in culture: a comparative study of growth, proliferation and collagen production in human and rabbit cardiac fibroblasts and their response to transforming growth factor-beta1. *Cell & Tissue Research*. 1997;288:87-93.
15. Brilla CG, Scheer C, Rupp H. Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix: modulation of cardiac fibroblast function by angiotensin II type 1 receptor antagonism. *Journal of Hypertension - Supplement*. 1997;15:S13-9.
16. Sano H. [Effect of angiotensin II on collagen metabolism in cultured rat cardiac fibroblasts: its relation to cardiac hypertrophy]. *Hokkaido Igaku Zasshi - Hokkaido Journal of Medical Science*. 1994;69:25-34.

17. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1994;26:809-20.
18. Brooks WW, Bing OH, Robinson KG, Slawsky MT, Chaletsky DM, Conrad CH. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat [see comments]. *Circulation*. 1997;96:4002-10.
19. Dayer JM, Roelke MS, Krane SM. Effects of prostaglandin E2, indomethacin, trifluoperazine and drugs affecting the cytoskeleton on collagenase production by cultured adherent rheumatoid synovial cells. *Biochemical Pharmacology*. 1984;33:2893-9.
20. Diaz A, Munoz E, Johnston R, Korn JH, Jimenez SA. Regulation of human lung fibroblast alpha 1(I) procollagen gene expression by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and prostaglandin E2. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:10364-71.
21. Mays PK, McAnulty RJ, Campa JS, Laurent GJ. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochemical Journal*. 1991;276:307-13.
22. Turner JE, Oliver MH, Guerreiro D, Laurent GJ. Collagen metabolism during right ventricular hypertrophy following induced lung injury. *American Journal of Physiology*. 1986;251:H915-9.
23. Eghbali M, Robinson TF, Seifter S, Blumenfeld OO. Collagen accumulation in heart ventricles as a function of growth and aging. *Cardiovascular Research*. 1989;23:723-9.



24. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Meggs LG, Capasso JM. Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circulation Research*. 1990;67:871-85.
25. Cornwell GGd, Thomas BP, Snyder DL. Myocardial fibrosis in aging germ-free and conventional Lobund-Wistar rats: the protective effect of diet restriction. *Journal of Gerontology*. 1991;46:B167-70.
26. Hinglais N, Heudes D, Nicoletti A, Mandet C, Laurent M, Bariety J, Michel JB. Colocalization of myocardial fibrosis and inflammatory cells in rats. *Laboratory Investigation*. 1994;70:286-94.
27. Lakatta EG. Do hypertension and aging have a similar effect on the myocardium? *Circulation*. 1987;75:I69-77.
28. Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circulation Research*. 1988;62:757-65.
29. Mamuya W, Chobanian A, Brecher P. Age-related changes in fibronectin expression in spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto, and Wistar rat hearts. *Circulation Research*. 1992;71:1341-50.
30. Norton GR, Tsotetsi J, Trifunovic B, Hartford C, Candy GP, Woodiwiss AJ. Myocardial stiffness is attributed to alterations in cross-linked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 1997;96:1991-8.
31. Medugorac I. Different fractions in the normal and hypertrophied rat ventricular myocardium: an analysis of two models of hypertrophy. *Basic Research in Cardiology*. 1976;71:608-23.
32. Tomanek RJ, Taunton CA, Liskop KS. Relationship between age, chronic exercise, and connective tissue of the heart. *Journal of Gerontology*. 1972;27:33-8.

33. Kiiskinen A, Heikkinen E. Physical training and connective tissues in young mice-heart. *European Journal of Applied Physiology & Occupational Physiology*. 1976;35:167-71.
34. Craig BW, Martin G, Betts J, Lungren M, Lambret V, Kaiserauer S. The influence of training-detraining upon the heart, muscle and adipose tissue of female rats. *Mechanisms of Ageing & Development*. 1991;57:49-61.
35. Aurich H, Lasch J. *Handbook of Histochemistry*. ;4, Part 1
36. Iwai N, Shimoike H, Kinoshita M. Genes up-regulated in hypertrophied ventricle. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1995;209:527-34.
37. Funck RC, Wilke A, Rupp H, Maisch B, Brilla CG. [Cardiac structure-function relationship and the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive heart disease]. [Review] [56 refs] [German]. *Herz*. 1995;20:330-9.
38. Meerson FZ. The myocardium in hyperfunction, hypertrophy and heart failure. *Circulation Research*. 1969;25:Suppl 2:1-163.
39. Morkin E. Activation of synthetic processes in cardiac hypertrophy. *Circulation Research*. 1974;35:suppl II:37-48.
40. Ferrans VJ. Growth of the heart in health and disease. In: eds. *Growth of the heart in health and disease*. 1984: 187-239.
41. Holubarsch C, Holubarsch T. Passive elastic properties of myocardium in different models and stages of hypertrophy and failure. In: Alpert NR, eds. *Perspectives in cardiovascular Research*. New York: Raven Press; 1985:
42. Thiedemann KU, Holubarsch C, Medugorac I, Jacob R. Connective tissue content and myocardial stiffness in pressure overload hypertrophy. A combined study of morphologic, morphometric, biochemical, and mechanical parameters. *Basic Research in Cardiology*. 1983;78:140-55.

43. Lakatta EG, Yin FC. Myocardial aging: functional alterations and related cellular mechanisms. *American Journal of Physiology*. 1982;242:H927-41.
44. Anversa P, Hiler B, Ricci R, Guideri G, Olivetti G. Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *Journal of the American College of Cardiology*. 1986;8:1441-8.
45. Spurgeon HA, Steinbach MF, Lakatta EG. Chronic exercise prevents characteristic age-related changes in rat cardiac contraction. *American Journal of Physiology*. 1983;244:H513-8.
46. Bishop S, Drummond JL. Cardiac ultrastructure. In: Sommer JR, Johnson EA, eds. *Handbook of physiology*. 121.
47. Brooksby P, Levi AJ, Jones JV. Contractile properties of ventricular myocytes isolated from spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension*. 1992;10:521-7.
48. Mattfeldt T, Kramer KL, Zeitz R, Mall G. Stereology of myocardial hypertrophy induced by physical exercise. *Virchows Archiv - A, Pathological Anatomy & Histopathology*. 1986;409:473-84.
49. Frenzel H, Schwartzkopff B, Höltermann W, Schnürch HG, Novi A, Hort W. Regression of cardiac hypertrophy: morphometric and biochemical studies in rat heart after swimming training. *J Mol Cell Cardiol*. 1988;20:737-751.
50. Thomas DP, McCormick KM, Jenkins RR. Effects of beta-adrenergic blockade on training-induced structural adaptations in rat left ventricle. *European Journal of Applied Physiology & Occupational Physiology*. 1988;57:671-6.
51. Moore RL, Musch TI, Yelamarty RV, Scaduto RC, Jr., Semanchick AM, Elensky M, Cheung JY. Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. *American Journal of Physiology*. 1993;264:C1180-9.

52. Wagner RC. Endothelial cell embryology and cell growth. *Advances in Microcirculation*. 1980;45-75.
53. Tomanek RJ, Searls JC, Lachenbruch PA. Quantitative changes in the capillary bed during developing, peak, and stabilized cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation Research*. 1982;51:295-304.
54. Loud AV, Beghi C, Olivetti G, Anversa P. Morphometry of right and left ventricular myocardium after strenuous exercise in preconditioned rats. *Laboratory Investigation*. 1984;51:104-11.
55. Rakusan K, Poupa O. Differences in capillary supply of hypertrophic and hyperplastic heartss. *Cardiologia*. 1966;49:293-298.
56. Bell RD, Rasmussen RL. Exercise and the myocardial capillary-fiber ratio during growth. *Growth*. 1974;38:237-244.
57. Mall G, Zimmer G, Baden S, Mattfeldt T. Capillary neoformation in the rat heart--stereological studies on papillary muscles in hypertrophy and physiologic growth. *Basic Research in Cardiology*. 1990;85:531-40.
58. Wachtlova M, Rakusan K, Roth Z, Poupa O. The terminal vascular bed of the myocardium in the wild rat (*Rattus norvegicus*) and the laboratory rat (*Rattus norvegicus* lab.). *Physiologia Bohemoslovaca*. 1967;16:548-54.
59. Lund DD, Tomanek RJ. Myocardial morphology in spontaneously hypertensive and aortic-constricted rats. *American Journal of Anatomy*. 1978;152:141-51.
60. Turek Z, Grandtner M, Kubat K, Ringnalda BE, Kreuzer F. Arterial blood gases, muscle fiber diameter and intercapillary distance in cardiac hypertrophy of rats with an old myocardial infarction. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*. 1978;376:209-15.
61. Mattfeldt T, Mall G. Wachstum von Herzmuskelfasern und Kapillaren in normalen Rattenherzen. *Zeitschrift für Kardiologie*. 1987;76 Suppl.I:

62. Tomanek RJ, Hovanec JM. The effects of long-term pressure-overload and aging on the myocardium. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1981;13:471-88.
63. Unge G, Carlsson S, Ljungqvist A, Tornling G, Adolfsson J. The proliferative activity of myocardial capillary wall cells in variously aged swimming-exercised rats. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section A, Pathology*. 1979;87:15-7.
64. Carlsson S, Ljungqvist A, Tornling G, Unge G. The myocardial capillary vasculature in repeated physical exercise. An experimental investigation in the rat. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section A, Pathology*. 1978;86:117-9.
65. Bloor CM, Leon AS. Interaction of Age and Exercise on the heart and Its Blood Supply. *Lab Invest*. 1970;22(2):160-165.
66. Jacobs TB, Bell RD, McClements JD. Exercise, age and the development of the myocardial vasculature. *Growth*. 1984;48:148-57.
67. Leon AS, Bloor CM. Effects of exercise and its cessation on the heart and its blood supply. *Journal of Applied Physiology*. 1968;24:485-90.
68. Tomanek RJ. Effects of age and exercise on the extent of the myocardial capillary bed. *Anatomical Record*. 1970;167:55-62.
69. Leon AS, Bloor CM. The effect of complete and partial deconditioning on exercise-induced cardiovascular changes in the rat. *Advances in Cardiology*. 1976;18:81-92.
70. Crisman RP, Rittman B, Tomanek RJ. Exercise-induced myocardial capillary growth in the spontaneously hypertensive rat. *Microvascular Research*. 1985;30:185-94.

71. Anversa P, Levicky V, Beghi C, McDonald SL, Kikkawa Y. Morphometry of exercise-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res.* 1983;52:57-64.
72. Anversa P, Beghi C, Levicky V, McDonald SL, Kikkawa Y, Olivetti G. Effects of strenuous exercise on the quantitative morphology of left ventricular myocardium in the rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1985;17:587-595.
73. Tharp GD, Wagner CT. Chronic exercise and cardiac vascularization. *European Journal of Applied Physiology & Occupational Physiology.* 1982;48:97-104.
74. Carlsson S, Ljungqvist A, Tornling G, Unge G. The reaction of the vascular pattern of the hypertrophied myocardium to increased cardiac volume load. A microangiographical study. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section A, Pathology.* 1978;86:297-301.
75. Ljungqvist A, Unge G, Carlsson S. The myocardial capillary vasculature in exercising animals with increased cardiac pressure load. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section A, Pathology.* 1976;84:244-6.
76. Holloszy JO, Schechtman KB. Interaction between exercise and food restriction: effects on longevity of male rats. *Journal of Applied Physiology.* 1991;70:1529-35.
77. Hudlicka O, Brown MD. Postnatal growth of the heart and its blood vessels. *Journal of Vascular Research.* 1996;33:266-87.
78. *The Cardiovascular Sytem*; Renkin EMM, C. Ch., Ed.; American Physiological Society: Bethesda, Maryland, 1984; Vol. IV, Part 1, Chapter 5, pp 168-169.
79. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-6.

80. Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Forstermann U, Murad F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88:365-9.
81. Snyder SH, Brecht DS. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1991;12:125-8.
82. Busse R, Hecker M, Fleming I. Control of nitric oxide and prostacyclin synthesis in endothelial cells. *Arzneimittel-Forschung*. 1994;44:392-6.
83. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;90:2092-6.
84. Pohl U, Lamontagne D, Bassenge E, Busse R. Attenuation of coronary autoregulation in the isolated rabbit heart by endothelium derived nitric oxide. *Cardiovascular Research*. 1994;28:414-9.
85. Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 1994;78:927-30.
86. Seki T, Naruse M, Naruse K, Yoshimoto T, Tanabe A, Imaki T, Hagiwara H, Hirose S, Demura H. Interrelation between nitric oxide synthase and heme oxygenase in rat endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*. 1997;331:87-91.
87. Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, Kelly RA, Smith TW, Michel T. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270:14582-6.

88. Seki T, Hagiwara H, Naruse K, Kadowaki M, Kashiwagi M, Demura H, Hirose S, Naruse M. In situ identification of messenger RNA of endothelial type nitric oxide synthase in rat cardiac myocytes. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1996;218:601-5.
89. Mourlon-Le Grand MC, Benessiano J, Levy BI. cGMP pathway and mechanical properties of carotid artery wall in WKY rats and SHR: role of endothelium. *American Journal of Physiology*. 1992;263:H61-7.
90. Hayakawa H, Raij L. The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function, and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension*. 1997;29:235-41.
91. Qiu C, Muchant D, Beierwaltes WH, Racusen L, Baylis C. Evolution of chronic nitric oxide inhibition hypertension: relationship to renal function. *Hypertension*. 1998;31:21-6.
92. Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses and inhibition of angiotensin-converting enzyme. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*. 1996;23:S23-9.
93. Luscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1986;8:344-8.
94. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension*. 1997;29:274-9.
95. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase [see comments]. *Nature*. 1995;377:239-42.



96. Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1996;16:981-7.
97. Bartosova D, Chvapil M, Korecky B, Poupa O, Rakusan K, Turek Z, Vizek M. The growth of the muscular and collagenous parts of the rat heart in various forms of cardiomegaly. *Journal of Physiology*. 1969;200:285-95.
98. Sunderland CA, McMaster WR, Williams AF. Purification with monoclonal antibody of a predominant leukocyte-common antigen and glycoprotein from rat thymocytes. *European Journal of Immunology*. 1979;9:155-9.
99. Holzinger C, Zuckermann A, Reinwald C, Imhof M, Schollhammer A, Kramer G, Wolner E, Steiner G. Are T cells from healthy heart really only passengers? Characterization of cardiac tissue T cells. *Immunology Letters*. 1996;53:63-7.
100. Gray D. Population kinetics of rat peripheral B cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1988;167:805-16.
101. Nicoletti A, Mandet C, Challah M, Bariety J, Michel JB. Mediators of perivascular inflammation in the left ventricle of renovascular hypertensive rats. *Cardiovascular Research*. 1996;31:585-95.
102. Olivetti G, Lagrasta C, Ricci R, Sonnenblick EH, Capasso JM, Anversa P. Long-term pressure-induced cardiac hypertrophy: capillary and mast cell proliferation. *American Journal of Physiology*. 1989;257:H1766-72.
103. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972;26:239-57.

104. Motoyama S, Minamiya Y, Saito S, Saito R, Matsuzaki I, Abo S, Inaba H, Enomoto K, Kitamura M. Hydrogen peroxide derived from hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell apoptosis in perfused hypoxic rat liver. *Gastroenterology*. 1998;114:153-63.
105. Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology*. 1997;272:H2313-9.
106. Diez J, Fortuno MA, Ravassa S. Apoptosis in hypertensive heart disease. [Review] [77 refs]. *Current Opinion in Cardiology*. 1998;13:317-25.
107. Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, Diez J. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan. *Hypertension*. 1998;32:280-6.
108. Diez J, Panizo A, Hernandez M, Vega F, Sola I, Fortuno MA, Pardo J. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:1029-34.
109. Kawaguchi H, Shin WS, Wang Y, Inukai M, Kato M, Matsuo-Okai Y, Sakamoto A, Uehara Y, Kaneda Y, Toyo-oka T. In vivo gene transfection of human endothelial cell nitric oxide synthase in cardiomyocytes causes apoptosis-like cell death. Identification using Sendai virus-coated liposomes. *Circulation*. 1997;95:2441-7.
110. Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Li P, Li B, Nitahara JA, Chapnick S, Reiss K, Olivetti G, Anversa P. Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *American Journal of Physiology*. 1996;271:H1215-28.

111. Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;101:1326-42.
112. Nitahara JA, Cheng W, Liu Y, Li B, Leri A, Li P, Mogul D, Gambert SR, Kajstura J, Anversa P. Intracellular calcium, DNase activity and myocyte apoptosis in aging Fischer 344 rats. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1998;30:519-35.
113. Liu L, Azhar G, Gao W, Zhang X, Wei JY. Bcl-2 and Bax expression in adult rat hearts after coronary occlusion: age-associated differences. *American Journal of Physiology*. 1998;275:R315-22.
114. Maulik N, Yoshida T, Das DK. Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 1998;24:869-75.
115. Wang E, Lee MJ, Pandey S. Control of fibroblast senescence and activation of programmed cell death. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1994;54:432-9.
116. Kockx MM, Muhring J, Knaapen MW, de Meyer GR. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis [see comments]. *American Journal of Pathology*. 1998;152:885-8.
117. Schaper J, Lorenz-Meyer S, Suzuki K. The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Herz*. 1999;24:219-24.
118. Grodzicki T, Michalewicz L, Messerli FH. Aging and essential hypertension: effect of left ventricular hypertrophy on cardiac function. *American Journal of Hypertension*. 1998;11:425-9.
119. Rakusan K, Korecky B. The effect of growth and aging on functional capillary supply of the rat heart. *Growth*. 1982;46:275-81.

120. Biggs RB, Booth FW. Protein synthesis rate is not suppressed in rat heart during senescence. *American Journal of Physiology*. 1990;258:H207-11.
121. van Loon AA, Timmerman AJ, van der Schans GP, Lohman PH, Baan RA. Different repair kinetics of radiation-induced DNA lesions in human and murine white blood cells. *Carcinogenesis*. 1992;13:457-62.
122. Rothstein M. Evidence for and against the error catastrophe hypothesis. In: eds. *Modern biological theories of aging*. New York: Raven Press; 1987: 139-154.
123. Hanawalt PC, Gee P, Ho L, Hsu RK, Kane CJ. Genomic heterogeneity of DNA repair. Role in aging?. [Review] [38 refs]. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1992;663:17-25.
124. Lampidis TJ, Schaiberger GE. Age-related loss of DNA repair synthesis in isolated rat myocardial cells. *Experimental Cell Research*. 1975;96:412-6.
125. Mullaart E, Boerrigter ME, Boer GJ, Vijg J. Spontaneous DNA breaks in the rat brain during development and aging. *Mutation Research*. 1990;237:9-15.
126. Morrell NW, Danilov SM, Satyan KB, Morris KG, Stenmark KR. Right ventricular angiotensin converting enzyme activity and expression is increased during hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovascular Research*. 1997;34:393-403.
127. Sun Y, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1996;28:851-8.
128. Ramires FJA, Sun Y, Weber KT. Myocardial fibrosis associated with aldosterone or angiotensin II administration: attenuation by calcium channel blockade. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1998;30:475-83.

129. Sun Y. Local angiotensin II and myocardial fibrosis. *Advances in Experimental Medicine & Biology*. 1997;432:55-61.
130. Sun Y, Weber KT. Fibrosis and myocardial ACE: possible substrate and independence from circulating angiotensin II. *Journal of Cardiac Failure*. 1994;1:81-9.
131. Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor- $\beta_1$  in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:1947-1958.
132. Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovascular Research*. 1998;40:352-63.
133. Parker TG, Schneider MD. Growth factors, proto-oncogenes, and plasticity of the cardiac phenotype. *Annual Review of Physiology*. 1991;53:179-200.
134. Li JM, Brooks G. Differential protein expression and subcellular distribution of TGFbeta1, beta2 and beta3 in cardiomyocytes during pressure overload-induced hypertrophy. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1997;29:2213-24.
135. Izumo S, Lompre AM, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *Journal of Clinical Investigation*. 1987;79:970-7.
136. Agrotis A, Saltis J, Dilley R, Bray P, Bobik A. Transforming growth factor-beta 1 and the development of vascular hypertrophy in hypertension. *Blood Pressure. Supplement*. 1995;2:43-8.

137. Di Nardo P, Fiaccavento R, Natali A, Minieri M, Sampaolesi M, Fusco A, Janmot C, Cuda G, Carbone A, Rogliani P, Peruzzi G. Embryonic gene expression in nonoverloaded ventricles of hereditary hypertrophic cardiomyopathic hamsters. *Laboratory Investigation*. 1997;77:489-502.
138. Porreca E, Di Febbo C, Mincione G, Reale M, Baccante G, Guglielmi MD, Cuccurullo F, Colletta G. Increased transforming growth factor-beta production and gene expression by peripheral blood monocytes of hypertensive patients. *Hypertension*. 1997;30:134-9.
139. Engelmann GL, Campbell SE, Rakusan K. Immediate postnatal rat heart development modified by abdominal aortic banding: analysis of gene expression. *Molecular & Cellular Biochemistry*. 1996;163-164:47-56.
140. Fisher SA, Absher M. Norepinephrine and ANG II stimulate secretion of TGF-beta by neonatal rat cardiac fibroblasts in vitro. *American Journal of Physiology*. 1995;268:C910-7.
141. Boluyt MO, Bing OH, Lakatta EG. The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *European Heart Journal*. 1995;16:19-30.
142. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Ishimura Y, Chatani F, Iwao H. Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. 1995;273:509-15.
143. Boluyt MO, Long X, Eschenhagen T, Mende U, Schmitz W, Crow MT, Lakatta EG. Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat heart. *American Journal of Physiology*. 1995;269:H638-47.

144. Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Ramires FJ. Angiotensin II, transforming growth factor-beta1 and repair in the infarcted heart. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1998;30:1559-69.
145. Keller M, Kong Y, Robertson AD, Horwitz L. Prevention of coronary vascular abnormalities early in reperfusion with TGF-beta may not prevent late coronary vascular injury. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1997;30:197-204.
146. McNeill H, Williams C, Guan J, Dragunow M, Lawlor P, Sirimanne E, Nikolics K, Gluckman P. Neuronal rescue with transforming growth factor-beta 1 after hypoxic-ischaemic brain injury. *Neuroreport*. 1994;5:901-4.
147. Lefer AM, Tsao P, Aoki N, Palladino MA, Jr. Mediation of cardioprotection by transforming growth factor-beta. *Science*. 1990;249:61-4.
148. Matthes T, Werner-Favre C, Tang H, Zhang X, Kindler V, Zubler RH. Cytokine mRNA expression during an in vitro response of human B lymphocytes: kinetics of B cell tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL)6, IL-10, and transforming growth factor beta 1 mRNAs. *Journal of Experimental Medicine*. 1993;178:521-8.
149. Annoni G, Luvara G, Arosio B, Gagliano N, Fiordaliso F, Santambrogio D, Jeremic G, Mircoli L, Latini R, Vergani C, Masson S. Age-dependent expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in the rat myocardium. *Mechanisms of Ageing & Development*. 1998;101:57-72.
150. Baird A, Klagsbrunn M. *The fibroblast growth factor family*. New York: New York Academy of Sciences; 1991
151. Spirito P, Fu YM, Yu ZX, Epstein SE, Casscells W. Immunohistochemical localization of basic and acidic fibroblast growth factors in the developing rat heart. *Circulation*. 1991;84:322-32.

152. Madias F, Hackshaw KV, Chiu IM. Characterization of the entire transcription unit of the mouse fibroblast growth factor 1 (FGF-1) gene. Tissue-specific expression of the FGF-1.A mRNA. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:11937-44.
153. Hudlicka O, Tyler KR. Angiogenesis: the Growth of the vascular system. In: eds. New York: Academic Press; 41-66.
154. Engelmann GL, Dionne CA, Jaye MC. Acidic fibroblast growth factor, heart development, and capillary angiogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991;638:463-6.
155. Lopez JJ, Edelman ER, Stamler A, Hibberd MG, Prasad P, Thomas KA, DiSalvo J, Caputo RP, Carrozza JP, Douglas PS, Sellke FW, Simons M. Angiogenic potential of perivascularly delivered aFGF in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *American Journal of Physiology*. 1998;274:H930-6.
156. Banai S, Jaklitsch MT, Casscells W, Shou M, Shrivastav S, Correa R, Epstein SE, Unger EF. Effects of acidic fibroblast growth factor on normal and ischemic myocardium. *Circulation Research*. 1991;69:76-85.
157. Cuevas P, Reimers D, Carceller F, Martinez-Coso V, Redondo-Horcajo M, Saenz de Tejada I, Gimenez-Gallego G. Fibroblast growth factor-1 prevents myocardial apoptosis triggered by ischemia reperfusion injury. *European Journal of Medical Research*. 1997;2:465-8.
158. Cuevas P, Carceller F, Lozano RM, Crespo A, Zazo M, Gimenez-Gallego G. Protection of rat myocardium by mitogenic and non-mitogenic fibroblast growth factor during post-ischemic reperfusion. *Growth Factors*. 1997;15:29-40.





## 7. Lebenslauf

Name : Peter Hofmann

Geburtsdatum : 27.05.1960

Geburtsort : Greifenstein-Arborn

Familienstand : verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung :

1966 – 1970 Grundschule Arborn und Beilstein

1970 – 1979 Johanneum Gymnasium Herborn

1979 Allgemeine Hochschulreife

Beruflicher Werdegang:

06/79 - 02/80 Industriearbeit , Fa. EOS, Driedorf

02/80 - 05/81 Zivildienst im Pflegebereich, Alten- und Pflegeheim, Herborn

06/81 - 07/81 Altenpflege, Alten- und Pflegeheim Herborn

08/81 - 10/81 Vorpraktikum Beschäftigungs- und Arbeitstherapie, PKH Herborn

11/81 - 04/82 Altenpflege, Altenheim Herborn

05/82 - 05/85 Schüler, Schule für Beschäftigungs- und Arbeitstherapie, Frankfurt-Höchst

05/85 Staatliche Prüfung als Beschäftigungs- und Arbeitstherapeut

08/85 - 12/86 Beschäftigungstherapeut, Neurologische Klinik, Bad Salzhausen

01/87 - 03/88 Beschäftigungstherapeut, Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik, Frankfurt

04/88 - 05/95 Studium der Humanmedizin, J.W. Goethe - Universität, Frankfurt

06/95 - 09/95 A.i.P. Neurologische Klinik, Bad Homburg

10/95 - 11/96 A.i.P. Neurologische Klinik, Weilmünster

12/96- 03/99 Assistenzarzt, Neurol. Klinik, Weilmünster

04/99 - 02/00 Promotionsarbeit und Erziehungsurlaub

seit 02/2000 Assistenzarzt, Neurologische Klinik, Offenbach



## 8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. h.c. J. Schaper für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die stete und engagierte Betreuung während der Erstellung der Dissertation.

Außerdem möchte ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Kardiologie Bad Nauheim ganz herzlich für die freundliche Anleitung und Unterstützung bei der praktischen Arbeit danken. Mein besonderer Dank gilt: Herrn Dr. Eyal Arnon, Herrn Dr. Borja Fernandez, Frau Beate Grohmann, Herrn Dr. Stefan Hein, Herrn Dr. Sava Kostin, Frau Dr. Silja Lorenz-Meyer, Frau Brigitte Matzke, Frau Renate Möhren, Frau Dr. Veronika Person, Herrn Dr. Dimitri Scholz, Herrn Gunther Schuster, Herrn Gerhard Stämmeler, Frau Dr. Claudia Strohm und Herrn Tibor Ziegelhöffer.